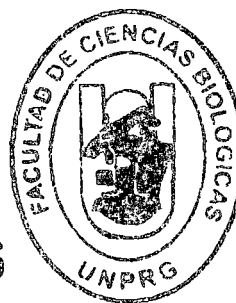


UNIVERSIDAD NACIONAL  
"PEDRO RUIZ GALLO"  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE MICROBIOLOGÍA  
Y PARASITOLOGÍA

"Caracterización de *Bacillus* spp. solubilizadoras  
de fosfato aisladas de *Zea mays* L. en el distrito  
de Reque en Lambayeque, junio - agosto, 2014"

# TESIS

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE

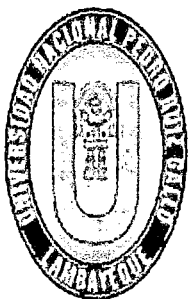
LICENCIADO EN BIOLOGÍA  
MICROBIOLOGÍA - PARASITOLOGÍA

PRESENTADO POR:

Br. LOREN STEPHANI ROMERO ZÚÑIGA  
Br. MILAGRITOS DEL PILAR ZAPATA SAMAMÉ

LAMBAYEQUE - PERÚ

2014



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
PEDRO RUIZ GALLO**



**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE MICROBIOLOGÍA Y  
PARASITOLOGÍA**

**“Caracterización de *Bacillus* spp. solubilizadoras  
de fosfato aisladas de *Zea mays* L. en el distrito  
de Reque en Lambayeque, junio-agosto, 2014”**

# **TESIS**

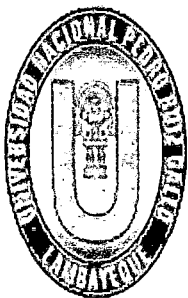
**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE**

**LICENCIADO EN BIOLOGÍA  
MICROBIOLOGÍA – PARASITOLOGÍA**

**PRESENTADO POR:**

**Br. LOREN STEPHANI ROMERO ZÚÑIGA  
Br. MILAGRITOS DEL PILAR ZAPATA SAMAMÉ**

**LAMBAYEQUE - PERÚ  
2014**



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
PEDRO RUIZ GALLO**



**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE MICROBIOLOGÍA Y  
PARASITOLOGÍA**

**“Caracterización de *Bacillus* spp. solubilizadoras de  
fosfato aisladas de *Zea mays* L. en el distrito de Reque  
en Lambayeque, junio-agosto, 2014”**

**TESIS**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE**

**LICENCIADO EN BIOLOGÍA  
MICROBIOLOGÍA – PARASITOLOGÍA**

**APROBADO POR:**

**M. Sc. CLARA AURORA CUEVA CASTILLO  
PRESIDENTE**

**Dr. CÉSAR ESTELA CAMPOS  
SECRETARIO**

**Lic. JULIO CÉSAR SILVA ESTELA  
VOCAL**

**Dra. CARMEN ROSA CARREÑO FARFÁN  
PATROCINADORA**

**LAMBAYEQUE, PERÚ  
2014**

# *Dedicatoria*

*Dedico este trabajo a Dios, y a la Virgen Rosa Mística por haberme dado la fortaleza de seguir adelante y por haberme bendecido con tanta dicha y felicidad.*

*A mis padres **ORLANDO ROMERO GONZALES** y **ROSA ZÚÑIGA ZAPATA**, por el apoyo y amor incondicional que en todo este tiempo me han brindado, porque son un gran ejemplo para mí y a lo largo de mi vida se han preocupado por mi bienestar, les estaré eternamente agradecida, los amo mucho.*

*A mi amor **ALDO QUEVEDO ROJAS** por el inmenso amor que en todo este tiempo me has brindado, eres alguien a quien admiro mucho, tú eres quien más me exigía en mi formación y por eso te aprecio aún más, te amo y sabes que eres todo para mí.*

*Loren Stephani*

# *Dedicatoria*

*Dedico este trabajo principalmente a Dios y la virgen María por haberme dado la vida y permitido el haber llegado hasta este momento tan importante de mi formación profesional.*

*A mis padres **ALEJANDRO ZAPATA SOPLAPUCO Y VILMA EUDOCIA SAMAMÉ CORTEZ** quienes a lo largo de mi vida han velado por mi bienestar y educación, me brindaron su amor y apoyo constante, me inculcaron grandes virtudes y me dieron sabios consejos, son mi fortaleza y gran motivación para seguir adelante, este logro es suyo, los amo*

*A mis hermanos Yovana, Noé, Jesús, Mariela y José quienes siempre han estado junto a mí y brindándome su apoyo, incondicional y por compartir conmigo buenos y malos momento.*

*Milagritos Del Pilar*

# *Agradecimiento*

*En primer lugar agradezco infinitamente a **DIOS** por bendecirme y darme fuerzas para superar obstáculos y dificultades a lo largo de toda mi vida.*

*A mis hermanas, abuelos, tíos y primos por estar presente en mis triunfos y derrotas, por alentarme a seguir adelante y superar cualquier adversidad. Espero que estén siempre orgullosos de mí.*

*A mi Asesora de Tesis Dra. **CARMEN ROSA CARREÑO FARFAN**, quien nos guió y nos brindó todo su apoyo y conocimientos en la elaboración de esta tesis.*

*A mis profesores por todo el conocimiento brindado, que me ayudo en mi formación académica y debido a esto ahora somos profesionales.*

*A mi compañera de tesis, **MILAGRITOS** mil gracias por la paciencia y por todas las experiencias vividas que a pesar de las dificultades siempre supimos juntas salir adelante.*

*Agradezco a mis compañeros de clases y del laboratorio que a lo largo del camino de una u otra manera me ayudaron, mil gracias por su colaboración y por brindarme su amistad.*

*Loren Stephani*

# *Agradecimiento*

*En primer lugar doy infinitamente gracias a **DIOS** por ser mi guía ya que sin él no hubiera sido posible este trabajo, por protegerme durante todo mi camino y darme fuerzas para superar obstáculos y adversidades a lo largo de mi vida.*

*A mi familia quienes sin duda alguna en el trayecto de mi vida me han demostrado su amor, corrigiendo mis faltas y celebrando mis triunfos, Porque si no fuera por ustedes no hubiese sido posible este triunfo.*

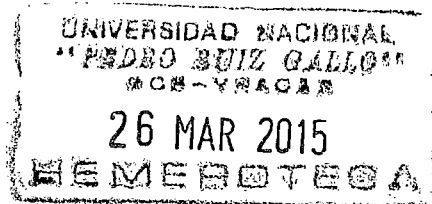
*A mi asesora de tesis **DRA. CARMEN ROSA CARREÑO FARFÁN** por su esfuerzo, dedicación, sabiduría, persistencia y paciencia ya que sin su apoyo no se hubiera logrado concretar este trabajo de investigación, le estaré eternamente agradecido.*

*A mis profesores que me orientaron y formaron como profesional, por brindarme sus conocimientos y experiencias vividas*

*A mi compañera de tesis **LOREN** mil gracias por todos los momentos vividos en el laboratorio y por haber culminado con éxito este trabajo de investigación.*

*A mis compañeros de clase y laboratorio por estar siempre presente a lo largo de todo este tiempo, por todos esos momentos compartidos en la universidad el cual nunca olvidare, por brindarme su amistad y apoyo incondicional.*

*Milagritos Del Pilar*



## ÍNDICE

UNIVERSIDAD NACIONAL "PEDRO RUIZ GALLO"
OFICINA CENTRAL DE BIBLIOTECA
PROCESOS TÉCNICOS
N.º DE REGISTRO:
COD. DE CLASIFICACIÓN:

I.	INTRODUCCIÓN .....	1
II.	ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS .....	3
	2.1 Antecedentes de la investigación .....	3
	2.2 Marco teórico .....	8
III.	MATERIALES Y MÉTODOS .....	13
	3.1 Material .....	13
	3.1.1 Material biológico .....	13
	3.1.2 Población y muestra de estudio .....	13
	3.2 Métodos .....	13
	3.2.1 Variables en estudio .....	13
	3.2.2 Tipo de estudio y diseño de contrastación de hipótesis .....	14
	3.2.3 Lugar de muestreo .....	14
	3.2.4 Obtención de muestras de suelo rizosférico .....	14
	3.2.5 Aislamiento de bacterias solubilizadoras de fosfato .....	21
	3.2.6 Identificación y mantenimiento de <i>Bacillus</i> spp .....	27
	3.2.7 Determinación del índice de solubilización de fosfato en medio sólido .....	27
	3.2.8 Cuantificación de fósforo soluble en medio líquido .....	35
	3.2.9 Análisis de datos .....	35
IV.	RESULTADOS .....	38
	4.1 Bacterias solubilizadoras de fosfato aisladas .....	38
	4.2 Especies de <i>Bacillus</i> identificadas .....	47
	4.3 Índice de solubilización en agar NBRIP con tres fuentes de fósforo inorgánico .....	47



4.4 Fósforo soluble en medio NBRIP líquido.....	53
V. DISCUSIÓN.....	61
VI. CONCLUSIONES.....	66
VII. RECOMENDACIONES.....	67
VIII. RESUMEN.....	68
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
X. ANEXOS.....	75

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b>	Posición de los puntos de muestreo de suelo rizosférico de <i>Zea mays</i> L. en Reque, durante junio - agosto de 2014 .....	16
<b>Tabla 2.</b>	Análisis físico - químico de suelo rizosférico de cultivos de <i>Zea mays</i> L. en Reque, Lambayeque, 2014.....	20
<b>Tabla 3.</b>	Diámetro (mm) del halo de solubilización de fosfato de bacterias termotolerantes solubilizadoras de fosfato aisladas en agar SRSM con fosfato dicálcico.....	42
<b>Tabla 4.</b>	Diámetro (mm) del halo de solubilización de fosfato de bacterias termotolerantes solubilizadoras de fosfato aisladas en agar NBRIP con fosfato tricálcico.....	43
<b>Tabla 5.</b>	Diámetro (mm) del halo de solubilización de fosfato de bacilos esporulados Gram positivos después de dos subcultivos en agar SRSM – fosfato dicálcico.....	44
<b>Tabla 6.</b>	Diámetro (mm) del halo de solubilización de fosfato de bacilos esporulados Gram positivos después de dos subcultivos en agar NBRIP – fosfato tricálcico.....	45
<b>Tabla 7.</b>	Características y frecuencia de morfotipos de <i>Bacillus</i> spp. aislados de suelo rizosférico de <i>Zea mays</i> L. en Lambayeque, 2014.....	48
<b>Tabla 8.</b>	Características diferenciales de especies de <i>Bacillus</i> solubilizadoras de fosfato, identificadas en suelo rizosférico de <i>Zea mays</i> L. en Lambayeque, 2014.....	49
<b>Tabla 9.</b>	Frecuencia de especies de <i>Bacillus</i> solubilizadoras de fosfato, identificadas en suelo rizosférico de <i>Zea mays</i> L. en Lambayeque, 2014.....	50

<b>Tabla 10.</b>	Rango del área de solubilización (mm <sup>2</sup> ) por <i>Bacillus</i> spp. nativas en agar NBRIP – fosfato dicálcico.....	52
<b>Tabla 11.</b>	Rango del área de solubilización (mm <sup>2</sup> ) por <i>Bacillus</i> spp. nativas en agar NBRIP – fosfato tricálcico.....	52
<b>Tabla 12.</b>	Rango del índice de solubilización por <i>Bacillus</i> spp. nativas en agar NBRIP – fosfato dicálcico.....	52
<b>Tabla 13.</b>	Rango del índice de solubilización por <i>Bacillus</i> spp. nativas en agar NBRIP – fosfato tricálcico.....	52
<b>Tabla 14.</b>	Análisis de la varianza (SC tipo III) del índice de solubilización de fosfato por <i>Bacillus</i> spp. aislada de la rizosféra de <i>Zea mays</i> L.....	54
<b>Tabla 15.</b>	Prueba de Kruskal - Wallis del índice de solubilización de fosfato por <i>Bacillus</i> spp. aisladas de la rizosféra de <i>Zea mays</i> L.....	55
<b>Tabla 16</b>	Rango de fósforo soluble en caldo NBRIP cultivado con <i>Bacillus</i> spp.....	57
<b>Tabla 17</b>	Análisis de la varianza (SC tipo III) de fósforo soluble en caldo NBRIP cultivado con <i>Bacillus</i> spp. aislada de la rizosféra de <i>Zea mays</i> L.....	57
<b>Tabla 18</b>	Prueba de Kruskal - Wallis de fósforo soluble en caldo NBRIP cultivado con <i>Bacillus</i> spp aisladas de la rizosféra de <i>Zea mays</i> L.....	58
<b>Tabla 19</b>	Fósforo soluble (ppm) en medio líquido cultivado con <i>Bacillus</i> spp. seleccionados por alcanzar los mayores índices de solubilización.....	60
<b>Tabla 20</b>	Índice de solubilización de <i>Bacillus</i> spp. seleccionado por alcanzar las mayores concentraciones (ppm) de fósforo soluble.....	61

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Ubicación del lugar de muestreo en el distrito de Reque, provincia de Chiclayo, región Lambayeque, julio, 2014.....	15
<b>Figura 2.</b>	Ubicación de los puntos de muestreo de suelo rizosférico de <i>Zea mays</i> L. en Reque, durante junio – agosto de 2014.....	17
<b>Figura 3.</b>	Cultivo de <i>Zea mays</i> L. en floración.....	18
<b>Figura 4.</b>	Extracción de raíces de <i>Zea mays</i> L.....	18
<b>Figura 5.</b>	Muestras de raíces con suelo rizosférico de <i>Zea mays</i> L.....	19
<b>Figura 6.</b>	Deshidratado de muestras de raíces con suelo rizosférico de <i>Zea mays</i> L.....	22
<b>Figura 7.</b>	Pesado de raíces con suelo rizosférico de <i>Zea mays</i> L.....	22
<b>Figura 8.</b>	Diluciones $10^{-1}$ de suelo rizosférico en solución salina.....	23
<b>Figura 9.</b>	Agitación manual de diluciones de suelo rizosférico.....	23
<b>Figura 10.</b>	Diluciones $10^{-2}$ de suelo rizosférico.....	24
<b>Figura 11.</b>	Tratamiento térmico de las diluciones de suelo rizosférico.....	24
<b>Figura 12.</b>	Siembra de la dilución de suelo rizosférico en agar NBRIP....	25
<b>Figura 13.</b>	Colonias de bacterias con zonas transparentes alrededor.....	25
<b>Figura 14.</b>	Observación microscópica (1000x) de bacilos Gram positivos esporulados.....	26
<b>Figura 15.</b>	Bacterias cultivadas por segunda vez en agar NBRIP.....	26
<b>Figura 16.</b>	Utilización del citrato como fuente de carbono y energía en agar citrato de Simmons. ....	28
<b>Figura 17.</b>	Prueba de oxidasa en tira reactiva.....	28

<b>Figura 18.</b>	Prueba de catalasa.....	29
<b>Figura 19.</b>	Producción de acidez a partir de glucosa (a) y arabinosa (b).....	29
<b>Figura 20.</b>	Producción de acidez a partir de xilosa (a) y manitol (b).....	30
<b>Figura 21.</b>	Halo de hidrólisis del almidón por <i>Bacillus</i> sp.....	30
<b>Figura 22.</b>	Precipitado rosado que denota la hidrólisis de lecitina por <i>Bacillus</i> spp.....	31
<b>Figura 23.</b>	Producción de acetoína en caldo rojo de metilo Voges - Proskauer.....	31
<b>Figura 24.</b>	Cultivos de bacilos Gram positivos solubilizadores de fosfato.....	32
<b>Figura 25.</b>	<i>Bacillus</i> spp. cultivados en agar NBRIP con fosfato dicálcico (a), tricálcico (b) y roca fosfórica de Bayóvar (c).....	33
<b>Figura 26.</b>	Medición del diámetro del halo de solubilización de fosfato por <i>Bacillus</i> sp.....	34
<b>Figura 27.</b>	Inoculación de <i>Bacillus</i> sp. en caldo NBRIP con fosfato tricálcico.....	36
<b>Figura 28.</b>	Centrifugación de submuestras de caldo NBRIP con fosfato tricálcico.....	36
<b>Figura 29.</b>	Coloración observada en la cuantificación de fósforo soluble por el método colorímetro del molibdato.....	37
<b>Figura 30.</b>	Bacterias termotolerantes solubilizadoras de fosfato aisladas de suelo rizosférico de <i>Zea mays</i> L. en Lambayeque, 2014.....	39
<b>Figura 31.</b>	Bacterias solubilizadoras de fosfato aisladas en agar NBRIP con fosfato tricálcico.....	40
<b>Figura 32.</b>	Bacterias solubilizadoras de fosfato aisladas en agar SRSM con fosfato dicálcico.....	40
<b>Figura 33.</b>	Frecuencia de bacilos y cocos solubilizadores de fosfato aislados en agar NBRIP y SRSM .....	41

<b>Figura 34.</b> Halos de solubilización de fosfato por <i>Bacillus</i> spp. en agar NBRIP con fosfato dicálcico.....	50
<b>Figura 35.</b> Halos de solubilización de fosfato por <i>Bacillus</i> spp. en agar NBRIP con fosfato tricálcico.....	51
<b>Figura 36.</b> Colonias de <i>Bacillus</i> spp. en agar NBRIP con roca fosfórica de Bayóvar.....	51

## I. INTRODUCCIÓN

El fósforo es un nutriente esencial para las biomoléculas, pero debido a su disponibilidad en el suelo, es limitante con el crecimiento de las plantas. Para satisfacer los requerimientos de P de los cultivos agrícolas como *Zea mays* L. “maíz” se aplican fertilizantes químicos fosforados; sin embargo, la eficiencia de recuperación o porcentaje del nutriente aplicado que es absorbido por la planta es un promedio 30% (SAGARPA, 2010) y el fertilizante no utilizado se pierde por “fijación” (Cordero *et al.*, 2008). El término “fijación” hace referencia a la transformación de los fosfatos del suelo a formas no asimilables a través de dos mecanismos: El primero incluye la formación de fosfato de calcio y adsorción a la superficie de las partículas del suelo y el segundo, que es el más importante es la adsorción por óxidos de hierro, hidróxidos, minerales y diversos complejos de aluminio y hierro (Aguado, 2012).

Los fosfatos inorgánicos insolubles pueden ser incorporados al ecosistema, a través del proceso microbiano de solubilización de fosfatos. Las bacterias solubilizadoras de fosfato como *Bacillus* spp. mediante la acción quelante de ácidos orgánicos, reducción de hierro y acidificación, desestabilizan los minerales, liberando fósforo soluble, que puede ser aprovechado (Cordero *et al.*, 2008; Becerra *et al.*, 2011; Alvarez, 2012); sin

embargo, para obtener estas bacterias se requiere en un inicio su aislamiento y caracterización en condiciones de laboratorio, para después determinar su efecto en invernadero y campo, con la perspectiva de obtener un inoculante natural a escala comercial. En la actualidad no se cuenta con bacterias solubilizadoras de fosfato propias de la zona, que puedan ser aplicadas en los cultivos agrícolas, para incrementar el desarrollo vegetativo y rendimiento.

El género *Bacillus* pertenece a la familia Bacillaceae, una de las que presenta mayor actividad bioquímica referenciada en la literatura científica, que abarca tanto su utilización para el control biológico de insectos plaga y fitopatógenos, como para la producción de metabolitos de importancia industrial. Las especies de *Bacillus* se encuentran en todos los tipos de suelo, tienen tolerancia térmica, se desarrollan rápidamente en medios líquidos y forman esporas altamente resistentes, que son estables y presentan viabilidad prolongada en los inoculantes y en el suelo después de la inoculación, características por las que son promisorias para su utilización como inoculantes microbianos.

Por lo expuesto, se planteó el siguiente problema: ¿Cuáles son las características de *Bacillus* spp. solubilizadoras de fosfato aisladas de *Zea mays* L. “maíz” en el distrito de Reque en Lambayeque?. El objetivo general fue: Determinar las características de *Bacillus* spp. solubilizadoras de fosfato, aisladas de suelo rizosférico de cultivos de maíz. Los objetivos específicos fueron: aislar bacterias termotolerantes solubilizadoras de fosfato, identificar fenotípicamente el género *Bacillus*, determinar el índice de solubilización en agar NBRIP con tres fuentes de fósforo inorgánico y cuantificar el fósforo soluble en medio NBRIP líquido. La hipótesis planteada fue: *Bacillus* spp. aisladas de suelo rizosférico de maíz solubilizan fosfato *in vitro*, obteniéndose índices de solubilización en medio sólido y fósforo soluble en medio líquido.



## II. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

### 2.1 Antecedentes de la investigación

En raíces de *Avicennia germinans* L. “manglares negros” y *Laguncularia racemosa* L. “manglares blancos”, se aislaron bacterias solubilizadoras de fosfato identificadas como: *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. atrophaeus* y *Paenibacillus macerans*. La actividad solubilizadora se demostró por halos transparentes formados alrededor de las colonias, desarrolladas en medio sólido con fosfato tricálcico. En medio líquido *B. atrophaeus* y *P. macerans* alcanzaron la fase estacionaria después de 24 horas, mientras que *B. amyloliquefaciens* y *B. licheniformis* a las 36 horas. Después, todas las especies formaron endosporas, proceso que coincidió con la reducción del fosfato solubilizado (Vázquez *et al.*, 2000).

En la rizósfera de *Glycine max* L. “soya” se obtuvieron 118 aislados de *Bacillus*, entre los que 76,3% sintetizó ácido indolacético. Estas bacterias ( $10^9$  cel mL<sup>-1</sup>) se inocularon en semillas pre-germinadas y después de 7 días se seleccionaron doce aislados de *Bacillus*, porque incrementaron significativamente la longitud de raíces y tallo o el número de raíces laterales de las plántulas. Todos los aislados produjeron sideróforos; 91,7% solubilizó fosfatos; 25% inhibió el crecimiento de *F. oxysporum*; 9% inhibió a *R. solani* y

8,3% inhibió a *Sclerotium rolfii*. El análisis del RNA 16S identificó a las bacterias como *Bacillus* spp., separándolas en cuatro grupos relacionadas con *B. pumilus*, *B. subtilis* y otras especies no precisadas, concluyéndose que tienen potencial para constituir biofertilizantes para el cultivo de soya (Wahyudi *et al.*, 2011).

Con el objetivo de aprovechar eficientemente el fósforo del suelo, se seleccionaron y evaluaron microorganismos solubilizadores de fosfato en suelos calcáreos. Se colectaron muestras de los primeros 30 cm de suelos cultivados con papa, cebada, avena y leguminosas, manejados bajo un sistema de rotación. Los microorganismos se aislaron en agar Pikovskaya con  $1000 \text{ mgL}^{-1}$  de P inorgánico, correspondientes a  $5 \text{ gL}^{-1}$  de fosfato tricálcico o  $7,6 \text{ gL}^{-1}$  de roca fosfórica de Bayóvar. Se obtuvieron 13 bacterias y 7 hongos, cuyos rangos fueron de 1,13-3,05 en el índice de solubilización y  $1,2-310,4 \text{ mm}^2$  en el área del halo de solubilización. Los microorganismos con los mayores valores se identificaron como *Bacillus*, *Clostridium* y *Pseudomonas* sp. En medio líquido *Clostridium* sp. alcanzó  $429 \text{ mg PL}^{-1}$ ;  $31,69 \text{ meqL}^{-1}$  de acidez titulable y el pH disminuyó de 6,9 a 4,1 (Alvarez, 2012).

El fósforo es uno de los nutrientes más limitantes en el crecimiento de las plantas, por lo que se realizó una investigación de *Bacillus* solubilizadores de fosfatos asociados al cultivo de arroz. Para el aislamiento, según el modelo Microcosmos, se tomaron raíces y parte aérea de plántulas de arroz de 14 días. Con el suelo rizosférico se obtuvieron diluciones, así como también, con raíces y hojas previamente desinfectadas y maceradas. En ambos casos, las diluciones se calentaron a  $80^\circ\text{C}$ , se sembraron en agar tripticosa soya y se incubaron a  $37^\circ\text{C}$ , por 24 horas. Se aislaron 58 morfotipos de *Bacillus*, 36 de la rizósfera y 20 endófitos de raíces y hojas. El 29,31% de las bacterias solubilizó fosfato en el medio sólido NBRIP, observándose una zona clara alrededor de las colonias. En medio líquido la concentración de fósforo soluble fue de  $0,23-11,58 \text{ mgL}^{-1}$ , determinándose el potencial de *Bacillus* spp. para la estimulación del crecimiento vegetal (Tejera *et al.*, 2013).

Con el objetivo de obtener bioinoculantes, se investigó la capacidad para solubilizar fosfato inorgánico de diez bacterias aisladas de suelo y 250 cepas

de *Bradyrhizobium*, obtenidas de nódulos de raíces de *Glycine max* L. "soya". El promedio de bacterias totales fue  $5,1 \times 10^6$  ufc g<sup>-1</sup> y de hongos  $3,3 \times 10^4$  ufc g<sup>-1</sup>, siendo 0,06 y 0,7% solubilizadores de fosfato, respectivamente. Las bacterias de suelo formaron halos de 4-15 mm en medio sólido National Botanical Research Institute Phosphate NBRIP, a 28°C, durante 7 días, superando al testigo *Pseudomonas fluorescens*, con 10 mm. A su vez, los halos formados por *Bradyrhizobium* spp. fueron de 5-12 mm. En medio líquido (5 gL<sup>-1</sup> de fosfato tricálcico), las bacterias solubilizaron 3-24% de fosfato y *Bradyrhizobium*, 7,1-8,5%. Se concluyó que la aplicación de estas bacterias en el suelo permitirá determinar su potencial como inoculantes para suelos deficientes en fósforo (Fernández *et al.*, 2005).

Se realizó un estudio de los microorganismos disolventes de fosfato, como promotores del crecimiento de *Lactuca sativa* L. "lechuga". Se colectaron muestras de suelo rizosférico, se diluyeron y se sembraron en agar nutritivo y papa dextrosa para el conteo de bacterias y hongos totales y medio mínimo con hidroxapatita para los solubilizadores de fosfato. En el conteo total, las bacterias ( $4,3 \times 10^7$  ufc g<sup>-1</sup>) predominaron frente a los hongos ( $1,2 \times 10^5$  ufc g<sup>-1</sup>). Asimismo, en los microorganismos fosfatodisolventes cultivables, el 67,4% correspondió a bacterias y 49,3% a hongos. Entre las bacterias aisladas, nueve indujeron nódulos en *Phaseolus vulgaris*, identificándose tres grupos, correspondientes a *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y un tercer género no definido. El 55% de los potenciales rizobios solubilizaron hidroxapatita, sintetizaron ácido indolacético e incrementaron (32,3%) el peso de las plantas de lechuga, 30 días después de la inoculación (Peña & Reyes, 2007).

La capacidad solubilizadora de fosfato se investigó en *Pantoea* sp, una bacteria endofítica aislada del tallo de caña de azúcar. En el centro de placas de Petri con medio NBRIP sólido se inocularon 10 µL de una suspensión de células de *Pantoea* sp. ( $10^8$  ufc mL<sup>-1</sup>). Después de la incubación a 30°C, los halos de solubilización presentaron un tamaño máximo de 6 mm, a las 172 horas. A su vez, en medio líquido se determinó que la concentración de P solubilizado fue 1128 µg P mL<sup>-1</sup> a las 167 horas de cultivo y el pH disminuyó de 7 a 4,65. Esta bacteria sobrevivió durante 35 días en un sustrato preparado con mezcla de vermiculita y suelo ferralítico rojo, alcanzando  $3,3 \times 10^{18}$  ufc g<sup>-1</sup>,

resultado, que se suma a su potencial como promotora del crecimiento de plantas (Cordero *et al.*, 2008).

Con el objetivo de evaluar caracteres PGPR en actinomicetos de *Trifolium repens* L. “trébol blanco”, se tomaron muestras de suelo rizosférico, se diluyeron en agua peptonada 0,1%, p/v y se sembraron en agar avena, obteniéndose 30 aislados. La caracterización bioquímica identificó mayoritariamente *Streptomyces*, *Nocardia* y *Pseudonocardia*. Para investigar la actividad solubilizadora de fosfato, 50 µL de una suspensión de células en solución salina 0,85%, p/v, se depositaron en agar Pikovskaya suplementado con roca fosfórica y agar SRSM-1, incubándose a 22°C, hasta por 14 días. El 66% de los actinomicetos presentó actividad solubilizadora en los dos medios, observándose zonas de aclaramiento y viraje del indicador, respectivamente. A su vez, 31% de bacterias evidenció acidez, pero no halos de solubilización (Franco, 2008).

El género *Azotobacter* y actinomicetos aislados de cultivo de *Solanum tuberosum* “papa” de zonas altoandinas fueron investigadas en su capacidad promotora del crecimiento vegetal. Se colectaron muestras de suelo rizosférico, se diluyeron en agua peptonada y se sembraron en medio mineral suplementado con púrpura de bromocresol y agar almidón caseína, obteniéndose 62 cultivos de *Azotobacter* spp. y 45 de actinomicetos. La solubilización de fosfato se investigó en medio NBRIP con fosfato tricálcico. En medio sólido se seleccionaron las colonias con halo transparente alrededor y en medio líquido se midió el pH durante 12 días. El 46,7% de *Azotobacter* spp. y 11% de actinomicetos solubilizaron fosfato, con halos que presentaron áreas de 0,11- 5,43 y 0,13- 0,35 cm<sup>2</sup>, respectivamente. En medio líquido el pH inicial de 7 disminuyó hasta 4,4 en *Azotobacter* sp. y 5,5 con los actinomicetos (Rico, 2009).

Con el objetivo de aislar y caracterizar microorganismos solubilizadores de fosfato, se colectaron muestras de suelos cultivados con *Physalis peruviana* L. “uchuva”. Las muestras se enriquecieron en caldo SRSM, se diluyeron en agua peptonada 0,1% (p/v) hasta 10<sup>-8</sup> y se sembraron en la superficie de agar SRSM por el método de microgota. Con los microorganismos aislados se

realizó la prueba cualitativa de solubilización de fosfato, para lo cual 50 µL de cada cultivo fueron depositados en anillos de 5 mm de diámetro sobre agar SRSM, incubándose a 35°C por 48 horas. Se consideraron solubilizadores de fosfato aquellos microorganismos con índice de solubilización mayor de 2,3 y mediante sistemas API se identificaron *Candida famata*, *Aeromonas hydrophila* y *Rohnella aquatilis* (Becerra et al., 2011).

Considerando la importancia del fósforo para el óptimo desarrollo de las plantas se realizó una investigación para caracterizar microorganismos solubilizadores de fosfato. Se tomaron muestras de rizósfera, rastros, malezas y materia orgánica en descomposición, las cuales previa dilución en solución salina (NaCl 0,85%, p/v) se sembraron en medio SMRS1. Después de la incubación a 30 °C, por 72 horas se seleccionaron 61 colonias bacterianas con halo de solubilización, de las que 93% correspondió a bacilos Gram negativos. En medio NBRIP, después de 7 días, se determinó un rango de 1,5 – 4,2 mm en el índice de solubilización (IS), presentando los mayores valores *Burkholderia cepacia*., *Pantoea* sp., *Pseudomonas putida*, *P. luteola*, *Aeromonas hydrophila* y *Enterobacter* sp. (Lara et al., 2011).

Con el objetivo de aislar y seleccionar microorganismos con potencial biofertilizante, se aislaron 15 bacterias acidolácticas y 30 actinomicetos en suelo cultivados con platano. Se investigó la solubilización de fosfato en agar SRSM y agar Pikovskaya, con fosfato tricálcico,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , como fuente de fósforo inorgánico. En medio sólido, se observaron halos de solubilización o zonas transparentes alrededor de las colonias y halos de acidificación, con viraje del indicador. A su vez, en medio líquido, se determinó la concentración de fósforo solubilizado, siendo de 2,718-340,769 ppm con las bacterias acidolácticas y 3,1-95,4 ppm con los actinomicetos. La secuenciación del gen ARNr16S identificó *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *Streptomyces ansochromogenes*, *S. bikiniensis*, *S. hygroscopicus* y *S. diastatochromogenes* (Otero, 2011).



## **2.2. Marco teórico**

### **2.2.1. El fósforo como elemento esencial y su dinámica en el suelo**

El fósforo es un nutriente inorgánico esencial para las plantas. Integra la estructura de los ácidos nucleicos y fosfolípidos. Está presente en las moléculas de transferencia de energía (ATP, ADP, AMP y pirofosfato), en procesos de síntesis y degradación y, además es parte esencial de glucosfosfatos que participan en la fotosíntesis y respiración (Coyne, 2000; Salisbury & Ross, 2000). Se le reconoce un papel fundamental como factor de crecimiento (estimula germinación de semillas, brotación de yemas, favorece la actividad de ápices vegetativos y crecimiento de raíces), es factor de precocidad (acorta la fase vegetativa y estimula la entrada de la planta en fase reproductiva adelantando la floración y favoreciendo la fecundación, cuajado y madurez de los frutos), es factor vigorizante (aumenta la resistencia al frío y a las enfermedades) y es factor de calidad, mejorando los caracteres organolépticos de frutos y hortalizas (Hernández & Chailloux, 2001; Urbano, 2001).

Los organismos vivos asimilan fósforo inorgánico como ion fosfato y en las células, es incorporado a los compuestos orgánicos por esterificación. Cuando una planta o un animal mueren, el fósforo se libera durante la descomposición y se regenera el fósforo inorgánico. El ciclo del fósforo implica transformaciones entre depósitos orgánicos e inorgánicos, así como entre formas insolubles y solubles, a través de los procesos microbianos de solubilización, inmovilización y mineralización del fósforo (Coyne, 2000).

En el suelo no existe fósforo libre sino iones fosfato, los que a su vez pueden estar como formas aniónicas o como parte de combinaciones. Las formas aniónicas pueden encontrarse libres en la solución suelo o fijas a diversas partículas, capaces de retenerlas y en ambos casos, se conocen como fósforo soluble, que puede ser absorbido por los vegetales (Coyne, 2000; Hernández & Chailloux, 2001). En los suelos ácidos, existe predominio de iones monovalentes ( $\text{PO}_4\text{H}_2^-$ ), mientras que en suelos neutros la proporción es de 50% entre iones mono y divalentes ( $\text{PO}_4\text{H}^{2-}$ ). A medida que se eleva el pH van desapareciendo las formas divalentes, dejando paso a los trivalentes

( $\text{PO}_4^{3-}$ ). Las plantas absorben principalmente ortofosfatos solubles monovalentes, seguido de los divalentes y, finalmente los de más difícil absorción, los trivalentes (Coyne, 2000).

Gran parte del fósforo pasa a su forma orgánica al ingresar a la raíz o después de ser transportado por el xilema hacia el tallo o las hojas. El fósforo no es reducido y permanece en forma de fosfato ya sea libre o bien unido a formas orgánicas del tipo de los ésteres. Las plantas con deficiencia de fósforo presentan enanismo y a diferencia de las que carecen de nitrógeno, a menudo tienen un color verde oscuro, la madurez se retrasa y en ocasiones se acumulan pigmentos del grupo de las antocianinas, desarrollándose una coloración púrpura rojizo con tallos cortos y delgados. El fósforo se redistribuye fácilmente en la mayor parte de la planta, pasando de un órgano a otro, se pierde en hojas antiguas y se acumula en hojas jóvenes, flores y semillas en desarrollo. Por esta razón, los síntomas de deficiencia en un inicio se presentan en hojas maduras (Salisbury & Ross, 2000).

Las combinaciones de fósforo pueden ser orgánicas e inorgánicas y ambas constituyen el fósforo no soluble. Las combinaciones inorgánicas o fosfatos precipitados en combinaciones minerales son denominadas también fosfato mineral que no puede ser absorbido por las plantas especialmente en suelos con pH extremos y en presencia de cationes libres (Coyne, 2000; Vázquez *et al.*, 2000). El pH del suelo puede inducir la fijación o precipitación del fósforo. Su asimilación es óptima en suelos con valores comprendidos entre 6,5 a 7,5. Cuando el pH es elevado (mayor o igual a 7,5 pero menor a 8,5) los fosfatos se asocian principalmente con calcio (carbonatos de calcio) y en suelos con pH ácido (inferior a 5,5), los fosfatos precipitan como fosfatos de hierro y de aluminio (estrongitas y variscitas). Los fosfatos precipitados necesitan ser solubilizados para liberar fósforo inorgánico soluble, que pueda ser utilizado por los vegetales (Rodríguez, 2002).

Desde un punto de vista funcional y de nutrición de los cultivos, se consideran tres fracciones de fósforo en el suelo: P en solución, P lábil y P no lábil. El P en solución, se encuentra inmediatamente disponible para que las plantas lo absorban. El lábil está adsorbido a la superficie de la fase sólida del

suelo y está en equilibrio directo y rápido con el P en solución, representando la cantidad de P disponible, que puede pasar a la solución durante la temporada del cultivo. El P no lábil corresponde al anión fosfato que queda absorbido en el interior de partículas de arcilla o de óxidos de hierro (difusión intrapartículas) y no se encuentra en equilibrio directo con la solución, pero sí con la fracción de P lábil. Por lo tanto, corresponde a los compuestos fosforados que no salen a la solución en una temporada del cultivo (Urbano, 2001).

Cuando se aplica un fertilizante químico al suelo, el P soluble puede o no llegar a la fracción de fósforo en solución. En el primer caso, la fracción de P en solución se incrementa, promoviendo el flujo hacia la fracción lábil, en la cual prácticamente queda adsorbido todo el P incorporado a la solución. Paralelamente se produce un gradiente de concentración con la fracción no lábil, comenzando un flujo lento de difusión vía intrapartícula vinculado a procesos de adsorción. Asimismo, dependiendo del pH y de la concentración de iones en la solución suelo, otra parte de P aplicado se precipita. Finalmente, una tercera parte del fósforo es inmovilizado al pasar a la materia orgánica como mecanismo propio de los microorganismos. De este modo, los procesos de transferencia y disponibilidad de fósforo ocurren mediante tres mecanismos: adsorción-desorción, precipitación-disolución y mineralización-inmovilización (Tisdale *et al.*, 1993; Urbano, 2001).

### **2.2.2 Solubilización microbiana de fósforo y su efecto en cultivos agrícolas**

La comunidad microbiana es el componente funcional más importante del suelo, debido a que juega un papel importante en el flujo de energía, transformación de nutrientes y reciclaje de elementos en el ambiente (Filip, 2002). La mayoría de microorganismos se encuentran interactuando en la rizósfera, donde existe una gran cantidad de sustancias orgánicas como aminoácidos, ácidos, carbohidratos, derivados de ácidos nucleicos, factores de crecimiento y enzimas de origen vegetal o microbiano (Ferrera, 1995). De acuerdo a la teoría de la Infalibilidad Microbiana, que sostiene que todo compuesto orgánico biológicamente sintetizado puede ser descompuesto por los microorganismos del suelo (Alexander, 1994), los exudados de raíces y



microorganismos son utilizados como fuentes de carbono y energía, liberándose productos de desecho como dióxido de carbono, hidrógeno y ácidos orgánicos (Alexander, 1994; Ferrera, 1995).

La teoría de la solubilización microbiana del fósforo sostiene que en la rizósfera existen bacterias y hongos que gracias a la excreción de ácidos orgánicos como fórmico, acético, propiónico, láctico, glucónico, glicólico, fumárico y succínico pueden solubilizar el fósforo, es decir liberar el fósforo que se encuentra fijado en el suelo (en combinaciones minerales), originando formas químicas solubles (ortofosfatos) que pueden ser absorbidos por las plantas. A estos microorganismos se le ha denominado solubilizadores de fósforo (MSF) y el proceso solubilización microbiana del fósforo (Díaz *et al.*, 2001; Rashid *et al.*, 2004; Morato *et al.*, 2006).

Los ácidos orgánicos producidos por los microorganismos disminuyen el pH del medio o bien forman quelatos, con lo cual se libera el fósforo de sus fuentes no disponibles (Whitelaw, 2000). La relación entre disminución del pH y solubilización de fosfato se demuestra en medios líquidos, donde en su mayoría, el incremento de la concentración de fósforo solubilizado está asociado a una disminución del pH y viceversa (Whitelaw, 2000).

La extensión en la cual un ácido orgánico es capaz de quelar cationes es influenciada mayormente por su estructura molecular, por sus grupos hidroxilos y carboxilos, de tal manera que los ácidos tricarboxílicos formarán quelatos más fuertes que los dicarboxílicos y monobásicos. Ejemplo, los quelatos del ácido cítrico con el calcio son fuertes, con el ácido málico y tartárico son menos fuertes y con el ácido láctico son débiles. Asimismo, se ha demostrado que los ácidos orgánicos solubilizan más fósforo que los ácidos inorgánicos, al mismo pH, con la diferencia principalmente debida a la quelación (Whitelaw, 2000).

El análisis cromatográfico de gases de medios de cultivo una vez libres de células bacterianas solubilizadoras de fósforo demostró la presencia de once ácidos orgánicos volátiles y no volátiles. Los ácidos producidos más frecuentemente fueron láctico, succínico, isovalérico, isobutírico y acético, observándose asimismo que la mayoría de las especies bacterianas producen más de un ácido orgánico (Vázquez *et al.*, 2000).

se han descrito varios mecanismos en la solubilización de fosfatos, no obstante, el principal es la producción de ácidos orgánicos, aunque también de ácidos inorgánicos como sulfhídrico, nítrico y carbónico; sin embargo, también se ha postulado que la excreción de protones acompañada de la asimilación del ion amonio es la explicación más probable para la solubilización microbiana del fósforo, en ausencia de producción de ácidos, así como también la acción de mecanismos reductores de los cationes (Reyes, 2003).

En suelos agrícolas, existe gran número de microorganismos entre los que predominan las bacterias que pueden ser benéficas o perjudiciales para la agricultura. Las bacterias benéficas que pueden establecer una relación simbiótica con las plantas o ser de vida libre en los suelos, en cuyo caso se encuentran muy próximas o sobre la superficie de las raíces, en lo que constituye la rizosfera (Ferrera, 1995). Las bacterias de vida libre o asociativa, que benefician a las plantas han sido denominadas rizobacterias promotoras del crecimiento o PGPR (plant growth promoting rhizobacteria), habiéndose postulado diferentes mecanismos a través de los que favorecen el crecimiento vegetal, uno de los cuales es la solubilización de nutrientes como el fósforo (Vázquez *et al.* 2000; Díaz, 2001).

Las bacterias que realizan la solubilización de fosfato o bacterias solubilizadoras del fósforo incluyen géneros como *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Vibrio*, *Xanthobacter*, *Enterobacter*, *Kluyvera*, *Micrococcus*, *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Flavobacterium*, *Burkholderia*, *Xanthomonas*, *Chromobacterium* (Vázquez *et al.* 2000; Díaz, 2001; Rashid *et al.*, 2004)

### **III. MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **3.1 Materiales**

##### **3.1.1 Material biológico**

El material biológico estuvo constituido por muestras de suelo rizosférico de maíz y cultivos de *Bacillus* spp. solubilizadores de fosfato.

##### **3.1.2 Población y muestra de estudio**

Se consideró como población las bacterias del género *Bacillus* del suelo rizosférico de cultivos de maíz en campos comerciales del distrito de Reque y como muestra se investigaron las bacterias provenientes de 54 unidades de muestreo, colectadas durante junio – agosto de 2014. El número de muestras fue calculado según la fórmula mencionada por Alvitres (2000), tomando en cuenta una prevalencia de 90% (Anexo 1), determinada por los autores en un muestreo piloto.

#### **3.2 Métodos**

##### **3.2.1 Variables en estudio**

Las variables cuantitativas fueron el índice de solubilización en medio sólido y fósforo soluble en medio líquido, cultivado con *Bacillus* spp. aislados de suelo rizosférico de maíz.

### **3.2.2. Tipo de estudio y diseño de contrastación de hipótesis**

El trabajo de investigación fue descriptivo y transeccional (Hernández *et al.*, 2003) y para contrastar la hipótesis se utilizó el diseño de una sola casilla de Goode y Hatt (Alvitres, 2000).

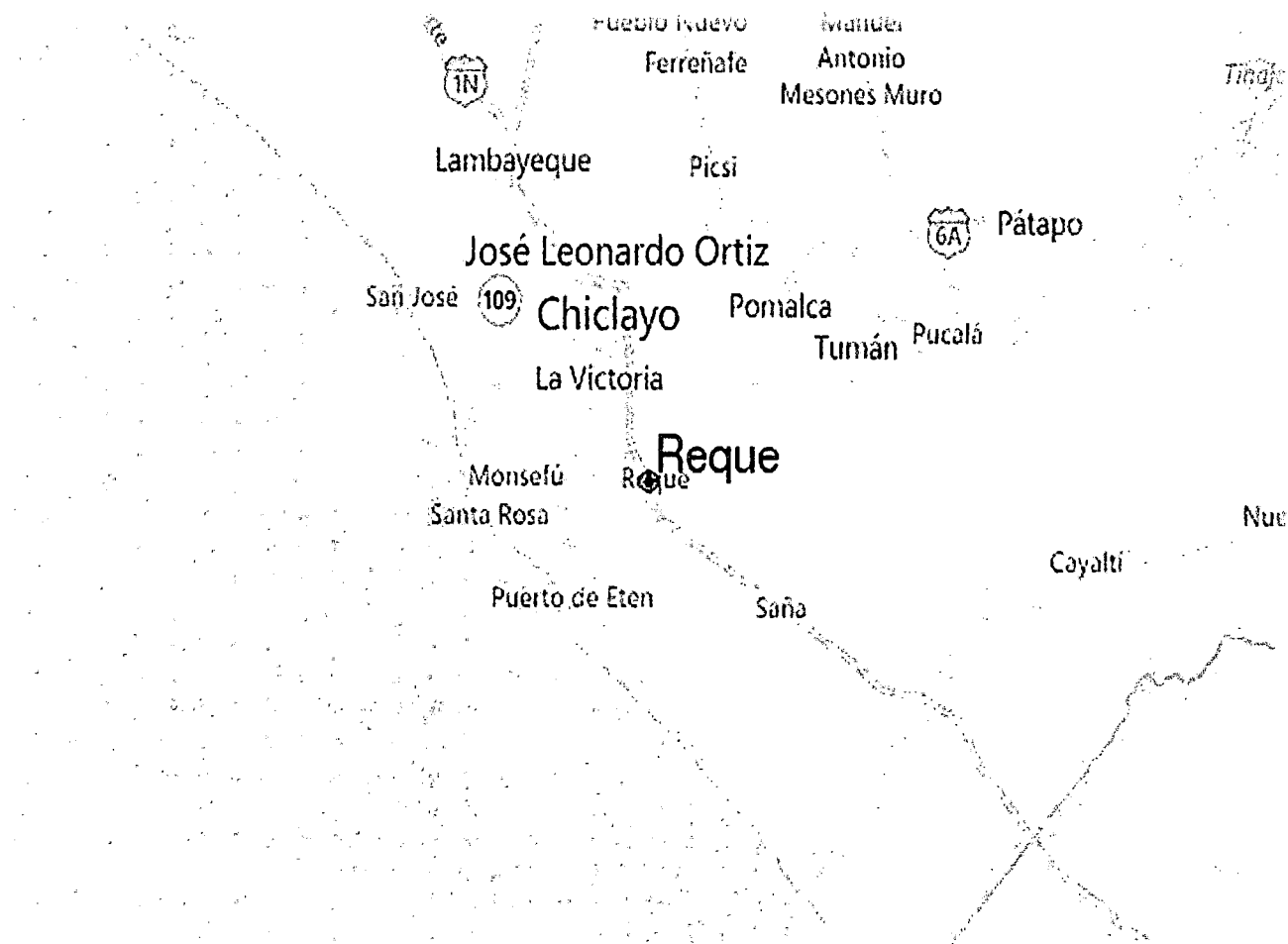
### **3.2.3. Lugar de muestreo**

Se colectaron 54 muestras de suelo rizosférico de cultivos de maíz, establecidos en 18 campos comerciales del distrito de Reque, región Lambayeque (Figura 1), determinando la posición de los puntos de muestreo (Tabla 1, figura 2) con un GPS GARMIN e Trex Vista HCx. El distrito de Reque tiene una superficie de 47,03 Km<sup>2</sup> y se ubica entre los paralelos 06° 52' 00" latitud sur y 79° 49' 27" longitud oeste (Municipalidad de Reque, 2013).

### **3.2.4. Obtención de muestras de suelo rizosférico**

En cultivos de maíz en fase de pre – floración y floración (Figura 3), se colectaron aproximadamente 50 g de raíces y suelo adherido (Figura 4), se depositaron en bolsas de polietileno debidamente identificadas (Figura 5), e inmediatamente se transportaron en una caja térmica (10±1°C), para su procesamiento en el laboratorio de Microbiología y Parasitología, sección Biotecnología Microbiana de la Facultad de Ciencias Biológicas, en la universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.

En simultáneo al muestreo de suelo rizosférico, se colectó una muestra representativa de 1 Kg de suelo para realizar el análisis físico-químico en el Instituto Nacional de Innovación y Extensión Agraria, Estación Experimental Vista Florida de Chiclayo. Según los resultados (Tabla 2), el suelo es medianamente alcalino (pH 7,6) y ligeramente salino (CE 2,24 dSm<sup>-1</sup>), con textura franco arenoso-arcilloso, niveles bajos de materia orgánica (2,3%), nitrógeno (0,103%) y fósforo disponible (5,9 ppm), así como un contenido medio de potasio (300,0 ppm).



**Figura 1.** Ubicación del lugar de muestreo en el distrito de Reque, provincia de Chiclayo, región Lambayeque, julio, 2014.  
(<http://www.google.com.pe/maps/>).

**Tabla 1.** Posición de los puntos de muestreo de suelo rizosférico de *Zea mays* L. en Reque, durante junio - agosto de 2014

<b>Campo agrícola</b>	<b>Punto</b>	<b>Posición (UTM)-17M</b>		<b>Msnm</b>	<b>Campo agrícola</b>	<b>Punto</b>	<b>Posición (UTM)-17</b>		<b>msnm</b>
1	1	629854	9241441	29	10	28	629703	9241540	27
2	2	629862	9241466	29	11	29	629701	9241554	27
3	3	629915	9241474	29	12	30	629725	9241559	26
4	4	629901	9241470	29	13	31	629741	9241563	27
5	5	629888	9241485	28	14	32	629733	9241569	27
6	6	629886	9241497	28	15	33	629733	9241575	27
7	7	629881	9241498	28	16	34	629746	9241578	26
8	8	629878	9241506	28	17	35	629779	9241610	27
9	9	629867	9241515	28	18	36	629768	9241608	28
10	10	629856	9241511	27	1	37	629765	9241584	27
11	11	629819	9241517	28	2	38	629766	9241568	27
12	12	629789	9241518	28	3	39	629778	9241577	27
13	13	629770	9241454	27	4	40	629785	9241564	25
14	14	629774	9241464	27	5	41	629792	9241562	27
15	15	629732	9241465	27	6	42	629801	9241570	27
16	16	629747	9241470	28	7	43	629877	9241571	27
17	17	629760	9241475	27	8	44	629867	9241577	28
18	18	629770	9241476	27	9	45	629852	9241571	28
1	19	629762	9241486	27	10	46	629844	9241579	28
2	20	629770	9241486	27	11	47	629844	9241572	27
3	21	629763	9241500	28	12	48	629816	9241571	27
4	22	629746	9241501	27	13	49	629828	9241567	27
5	23	629758	9241518	27	14	50	629830	9241559	26
6	24	629758	9241526	27	15	51	629833	9241547	27
7	25	629725	9241526	27	16	52	629836	9241528	27
8	26	629703	9241540	27	17	53	629837	9241536	26
9	27	629867	9241515	28	18	54	629843	9241532	27



**Figura 2.** Ubicación de los puntos de muestreo de suelo rizosférico de *Zea mays* L. en Reque, durante junio – agosto de 2014.



**Figura 3.** Cultivo de *Zea mays* L. en floración.



**Figura 4.** Extracción de suelo rizosférico de *Zea mays* L.





**Figura 5.** Muestras de raíces con suelo rizosférico de *Zea mays* L.

**Tabla 2.** Análisis físico- químico de suelo rizosférico de cultivos de *Zea mays* L. en Reque, Lambayeque, 2014\*

<b>Clase Textural</b>	<b>pH</b>	<b>CE (dSm<sup>-1</sup>)</b>	<b>MO (%)</b>	<b>N (%)</b>	<b>P (ppm)</b>	<b>K (ppm)</b>
Fr.Ar.Ao	7,69	2,24	2,3	0,103	5,9	300,0

\*Laboratorio de Suelos, Estación Experimental Vista Florida

Instituto Nacional de Innovación y Estación Agraria, Lambayeque.

### 3.2.5 Aislamiento de bacterias solubilizadoras de fosfato

Las muestras de raíces con suelo rizosférico adherido se depositaron en bandejas de polietileno, bajo sombra (Figura 6), a temperatura ambiente, por 72 horas. Después, se cortaron en fragmentos de aproximadamente 5 cm, aleatoriamente se tomaron submuestras de 10 g de raíces junto con el suelo adherido y se depositaron en frascos de 250 mL de capacidad (Figura 7, 8), conteniendo 90 mL de solución salina esterilizada (NaCl 0,85%, p/v).

Después de agitar el contenido de los frascos ( $10^{-1}$ ) manualmente (Figura 9), durante 10 minutos, se realizó una segunda dilución,  $10^{-2}$  (Figura 10). Para favorecer el aislamiento de bacterias esporuladas según Altuna & Pelaez (2013), las diluciones fueron llevadas a tratamiento térmico a 80°C, durante 10 minutos (Figura 11) y luego se enfriaron rápidamente. A continuación, se tomaron alícuotas y se sembraron (Figura 12), por duplicado en agar Sundara, Rao & Sinha medium (SRSM) y agar National Botanical Research Institute (NBRI) con  $1 \text{ gL}^{-1}$  P, correspondientes a  $5,6 \text{ gL}^{-1}$  de fosfato dicálcico y  $5,0 \text{ gL}^{-1}$  de fosfato tricálcico, respectivamente, como fuentes de fósforo inorgánico insoluble (Vázquez *et al.*, 2000). Ambos medios de cultivo fueron suplementados con 45 mg de Fluconazol para inhibir el crecimiento de hongos (Anexo 2).

Las placas de Petri sembradas fueron incubadas a 30°C, durante 96 horas y las colonias de bacterias desarrolladas que presentaron halozonas, zonas transparentes alrededor o halos de solubilización (Figura 13), se consideraron solubilizadoras de fosfato (Vázquez *et al.*, 2000). Se midió el diámetro de los halos de solubilización y se realizaron tinciones de Gram para seleccionar bacilos Gram, positivos esporulados (Figura 14), con los que se verificó la estabilidad la actividad solubilizadora, cultivándolos dos veces consecutivas en el mismo agar de procedencia (Figura 15) y después de la incubación se midió el diámetro del halo de solubilización.

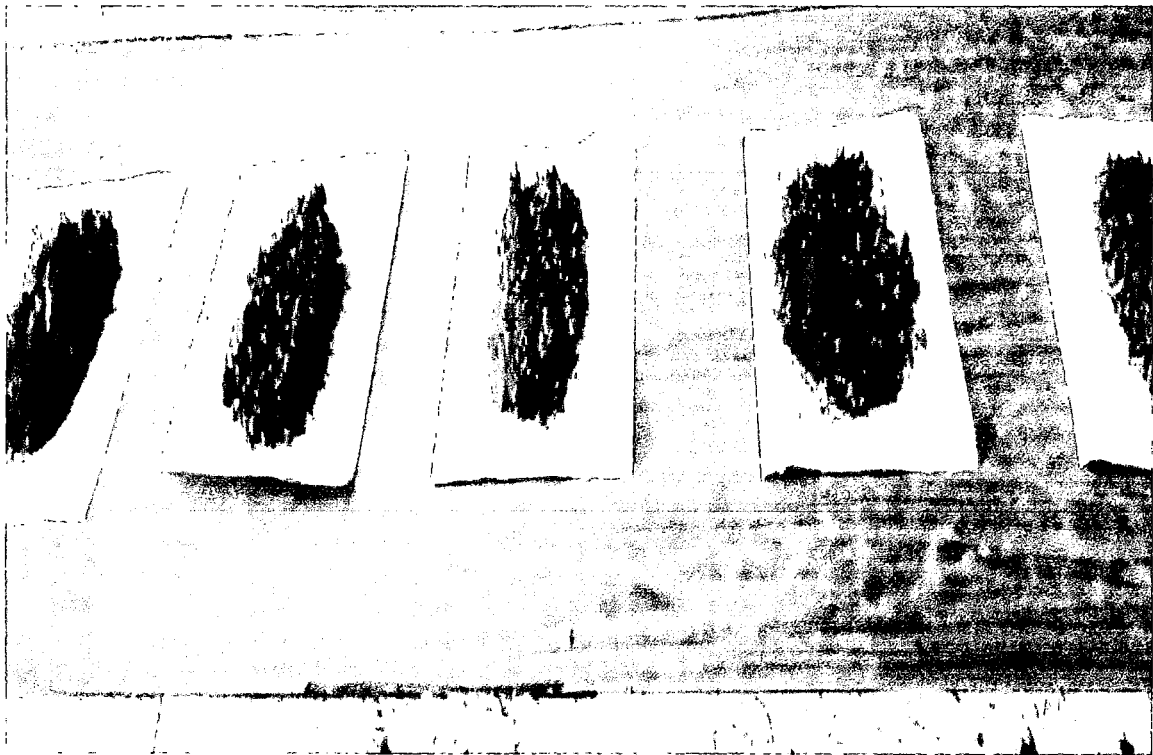
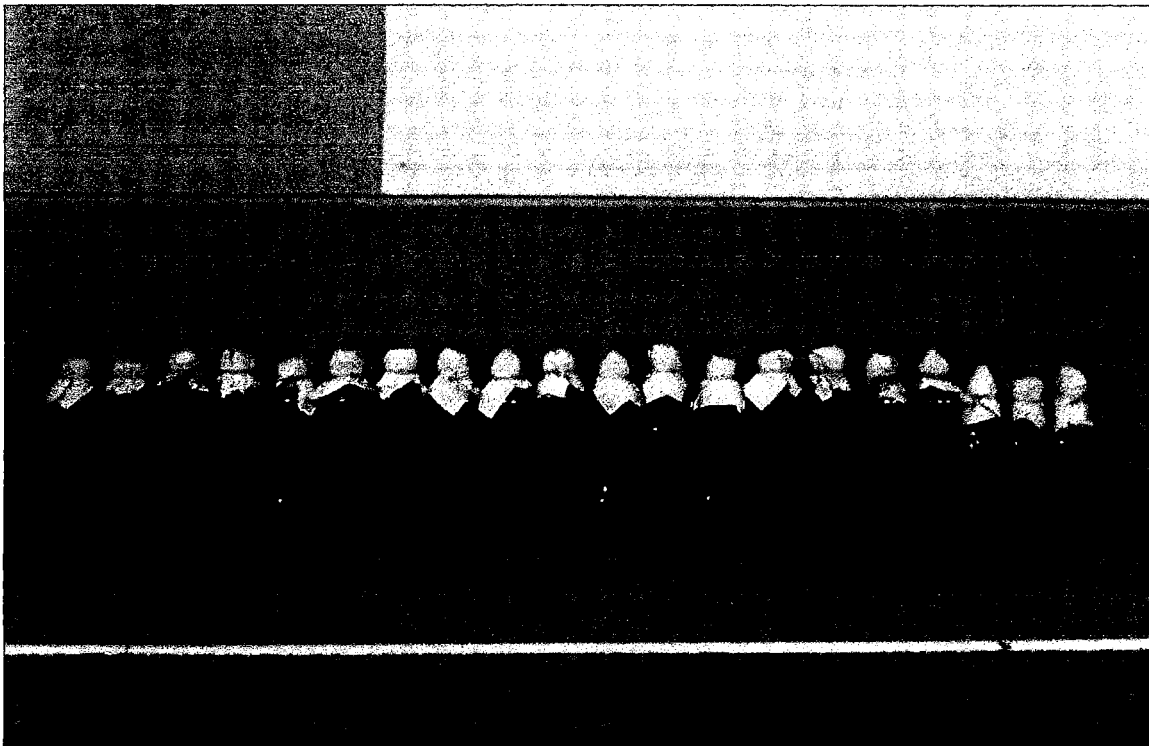


Figura 6. Deshidratado de muestras de raíces con suelo rizosférico de *Zea mays* L.



Figura 7. Pesado de raíces con suelo rizosférico de *Zea mays* L.



**Figura 8.** Diluciones  $10^{-1}$  de suelo rizosférico en solución salina esterilizada.



**Figura.9** Agitación manual de diluciones de suelo rizosférico.

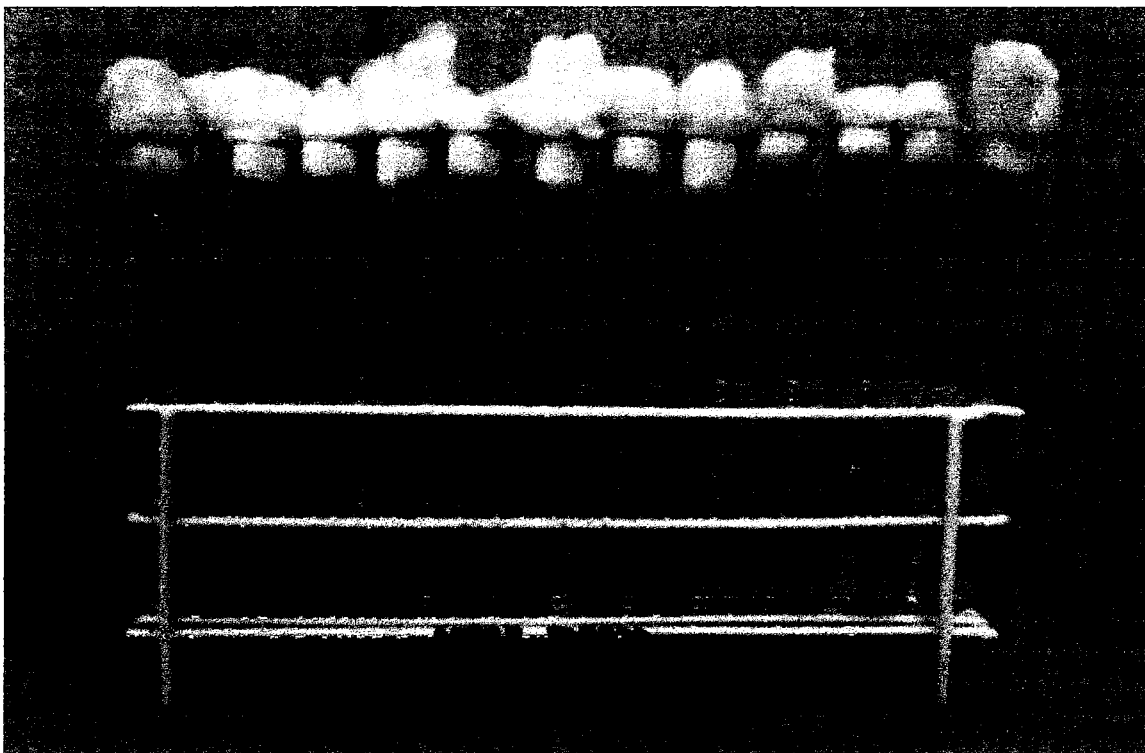


Figura 10. Diluciones  $10^{-2}$  de suelo rizosférico.

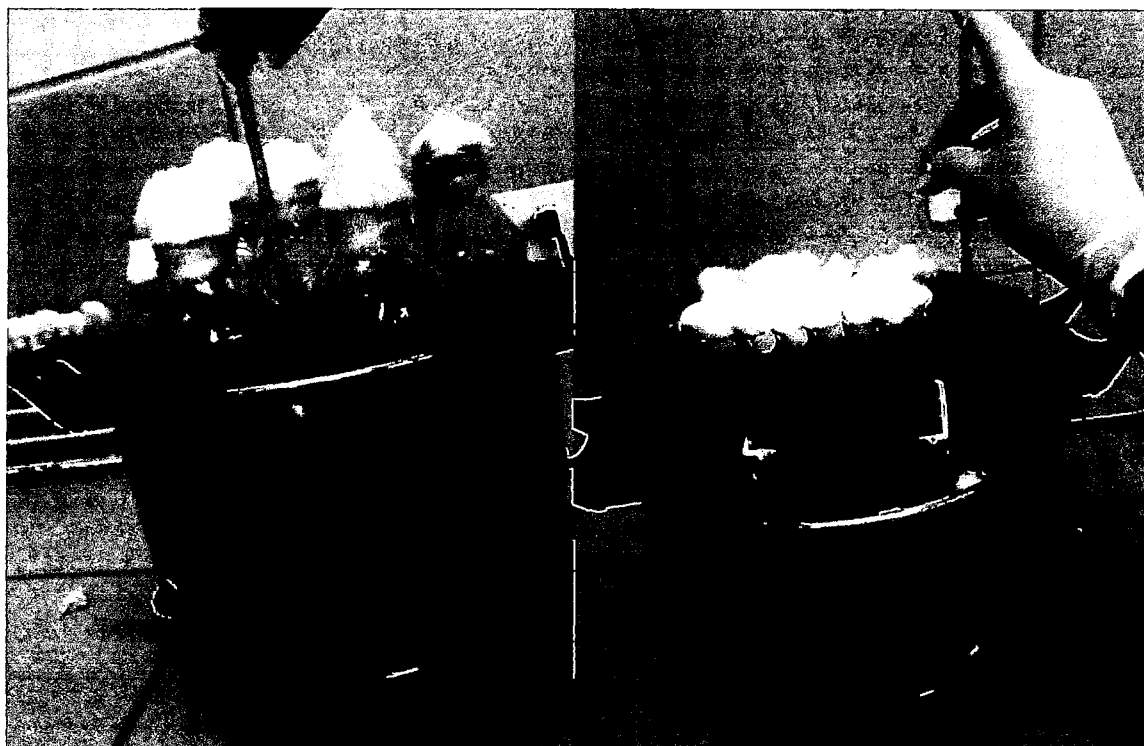
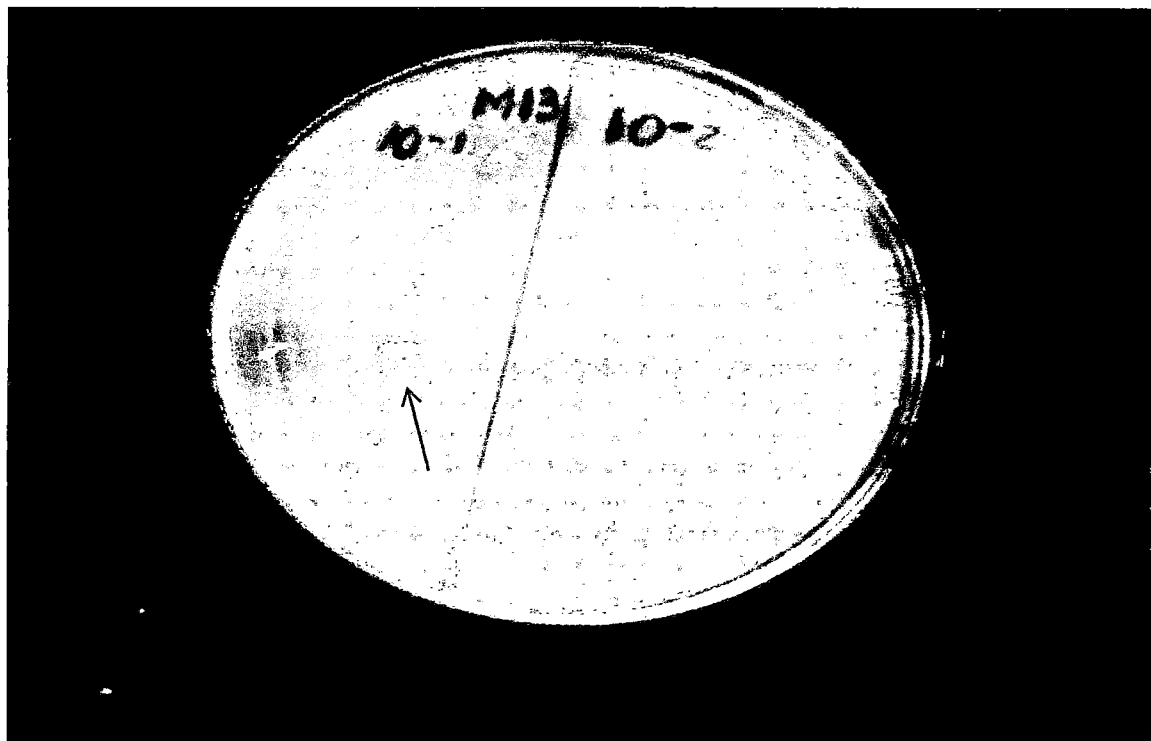


Figura 11. Tratamiento térmico de las diluciones de suelo rizosférico.



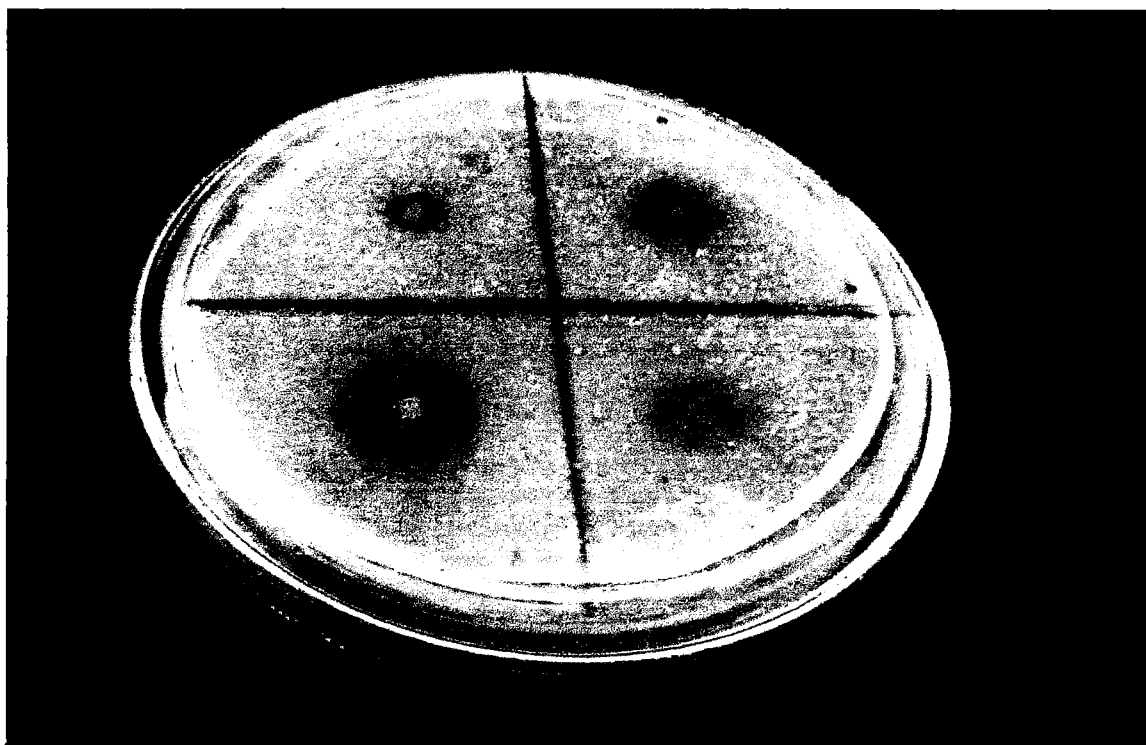
**Figura 12.** Siembra de la dilución de suelo rizosférico en agar NBRIP.



**Figura 13.** Colonias de bacterias con zonas transparentes alrededor.



**Figura 14.** Observación microscópica (1000x) de bacilos Gram positivos esporulados.



**Figura 15.** Bacterias cultivadas por segunda vez en agar NBRIP.



### 3.2.6. Identificación fenotípica y mantenimiento de *Bacillus* spp.

La identificación del género *Bacillus* según Brenner *et al.* (2005), Cuervo, (2010) y Perleche & Renteria (2013), se realizó con base a las características fenotípicas, investigando la posición de la espora, utilización del citrato como fuente de carbono y energía, pruebas de oxidasa y catalasa, producción de acidez a partir de glucosa, arabinosa, xilosa y manitol, hidrólisis de almidón y lecitina y producción de acetoina o 2,3 butanodiol en la prueba de Voges-Proskauer (Figuras 16 a 23), Para su mantenimiento, las bacterias fueron sembradas en agar tripticasa soya, durante 24 horas y luego fueron llevadas a refrigeración (8°C), realizándose subcultivos cada 30 días (Figura 24).

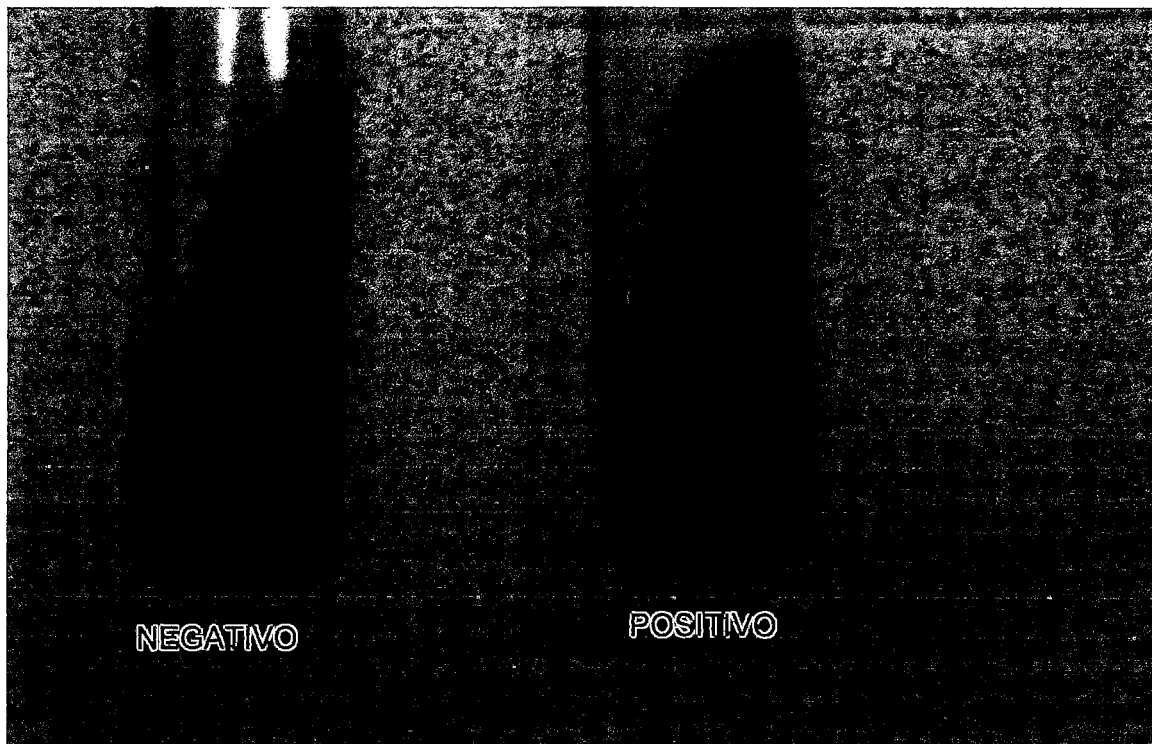
### 3.2.7. Determinación del índice de solubilización de fosfato en medio sólido

Para la determinación del índice de solubilización de fosfato en medio sólido según Lara *et al.* (2011), las bacterias del género *Bacillus* cultivadas en agar tripticasa soya (TSA) durante 24 horas, se sembraron por triplicado, mediante la técnica de puntura superficial en agar NBRIP (Figura 25) con 1 gL<sup>-1</sup>P inorgánico, diicálcico, tricálcico y roca fosfórica de Bayóvar. Para alcanzar las concentraciones requeridas se agregaron 5,6 g de fosfato dicálcico 5,0 g de fosfato tricálcico y 7,65 g de roca fosfórica de Bayóvar (Anexo 3).

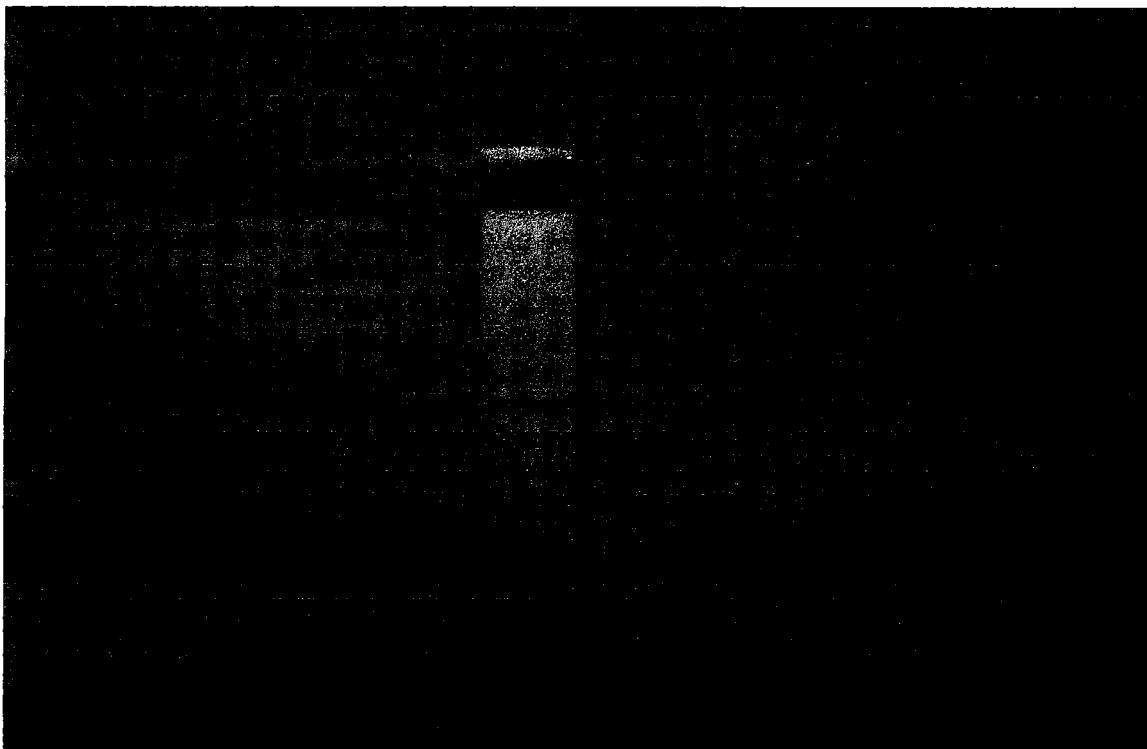
Las placas de Petri se incubaron a 30°C, durante 96 horas y cada 24 horas se midió el diámetro de la colonia bacteriana y diámetro de la colonia más halo de solubilización (Figura 26). Con los valores obtenidos a las 96 horas se calculó el área e índice de solubilización de fosfato, según las fórmulas mencionadas por García y Alvarez (2012).

$$\text{Área de solubilización} = \pi r^2$$

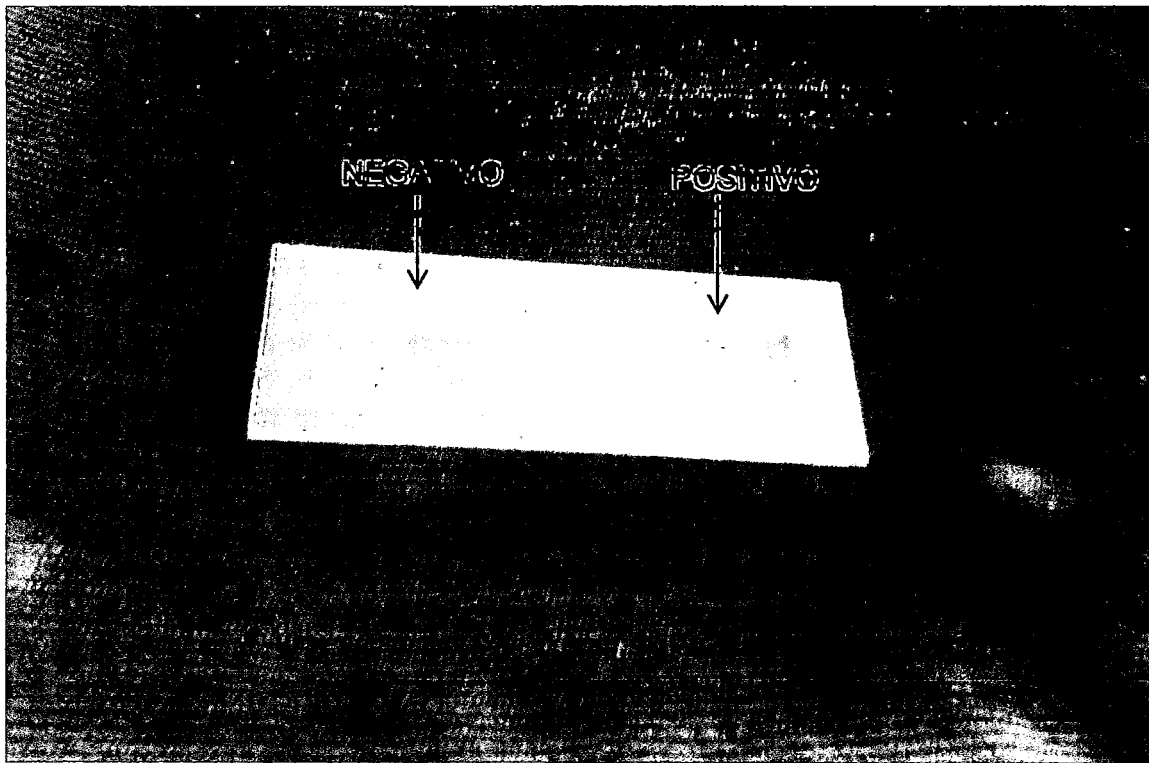
$$\text{Índice de solubilización} = \frac{\varnothing \text{ Colonia} + \text{halo}}{\varnothing \text{ Colonia}}$$



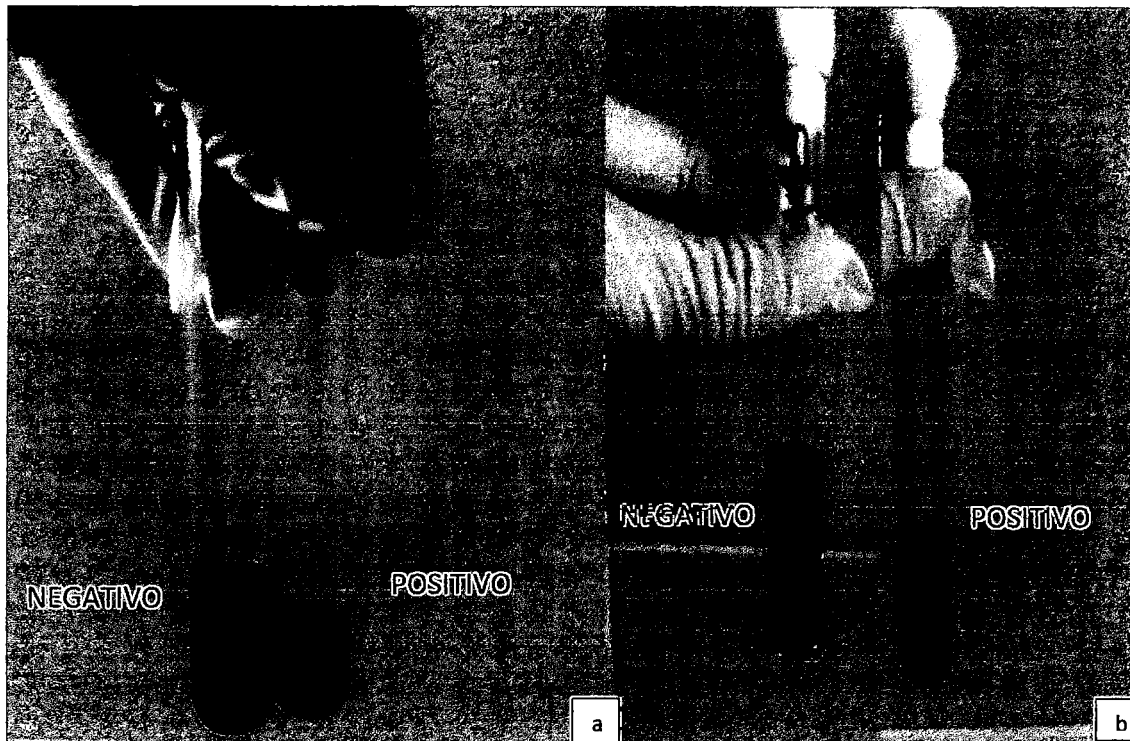
**Figura 16.** Utilización del citrato como fuente de carbono y energía en agar citrato de Simmons.



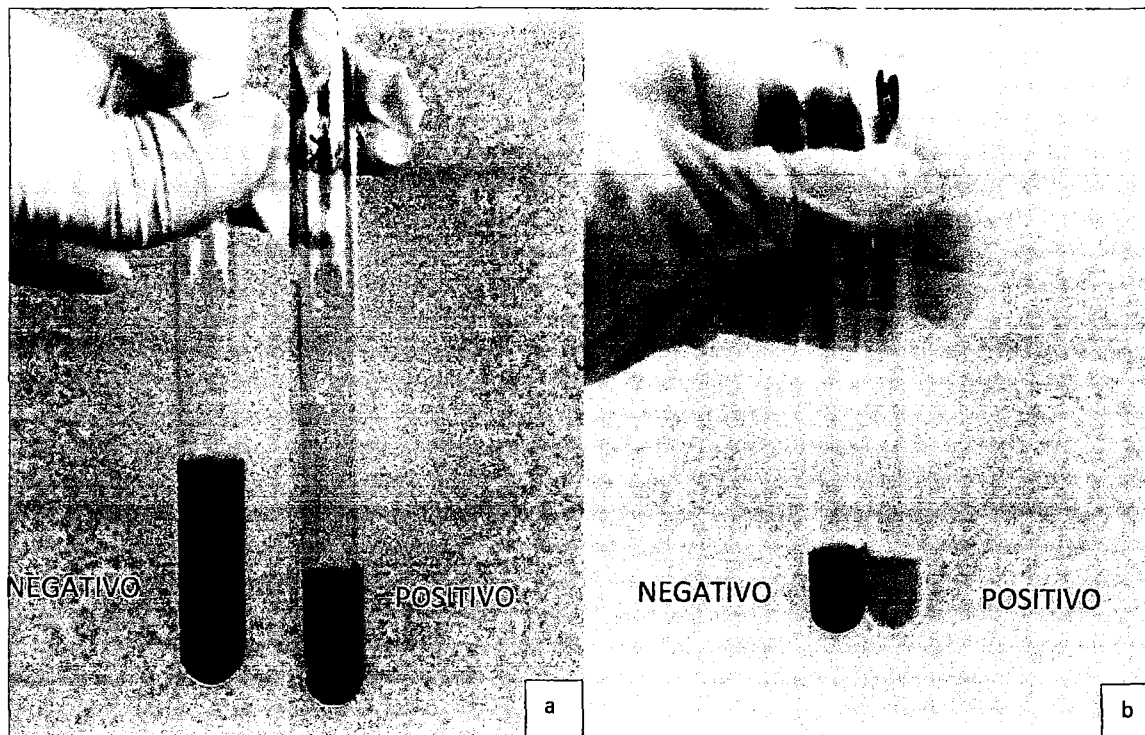
**Figura 17.** Prueba de oxidasa en tira reactiva.



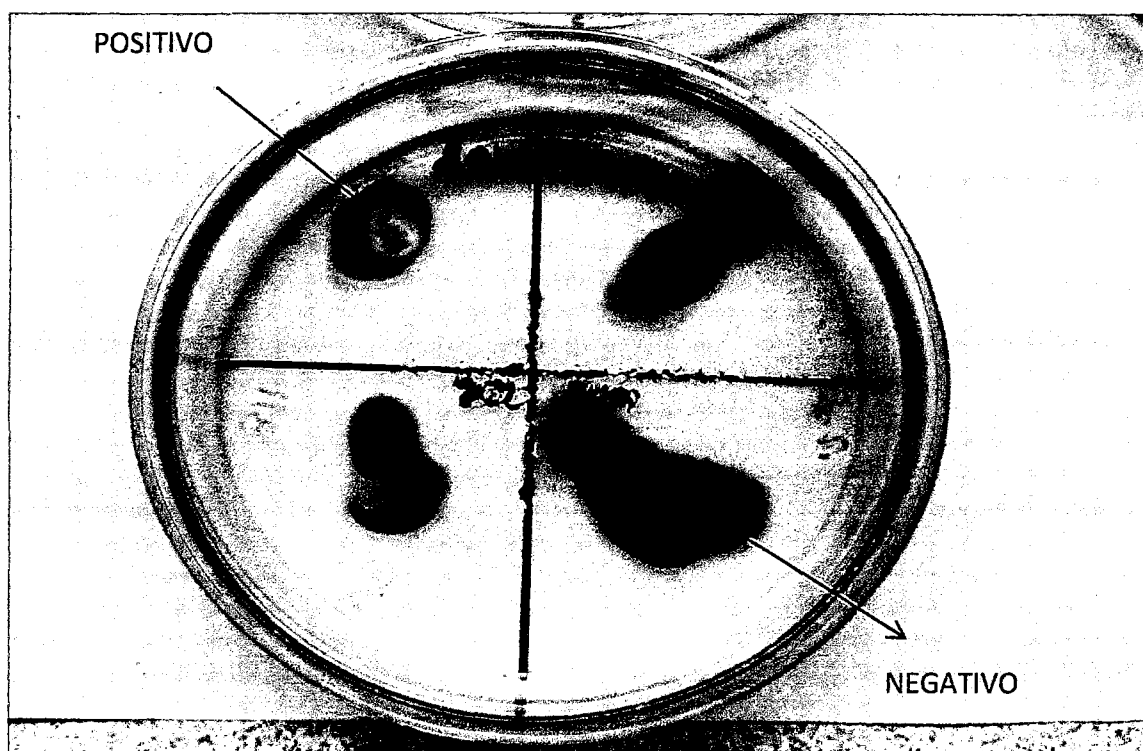
**Figura 18.** Prueba de catalasa.



**Figura 19.** Producción de acidez a partir de glucosa (a) y arabinosa (b).



**Figura 20.** Producción de acidez a partir de xilosa (a) y manitol (b).



**Figura 21.** Halo de hidrólisis del almidón por *Bacillus* sp.

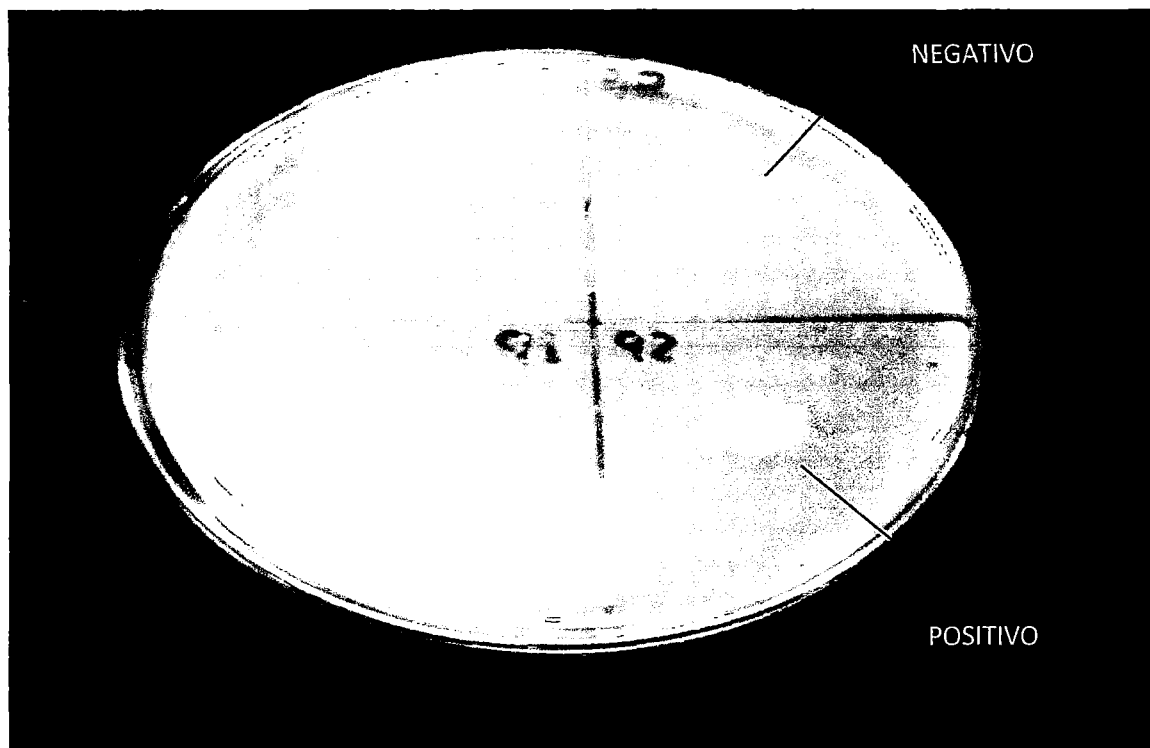


Figura 22. Precipitado rosado que denota la hidrólisis de lecitina por *Bacillus* spp.

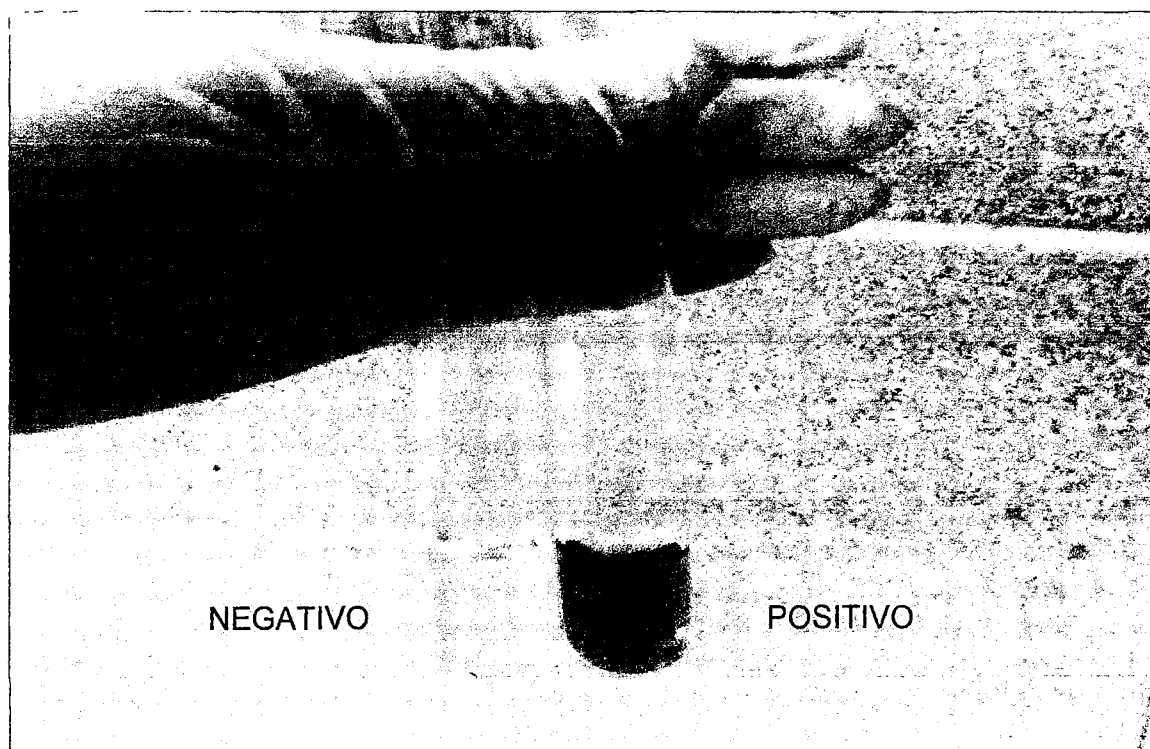
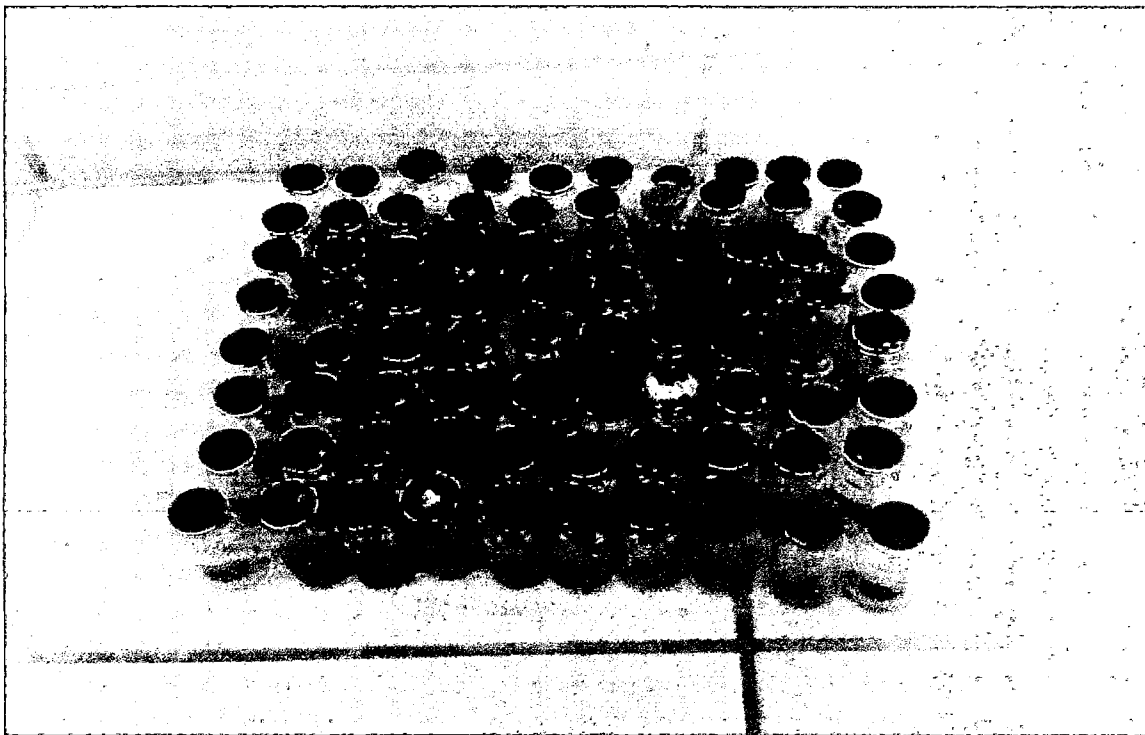


Figura 23. Producción de acetoína en caldo rojo de metilo Voges - Proskauer.



**Figura 24.** Cultivos de bacilos Gram positivos solubilizadores de fosfato.

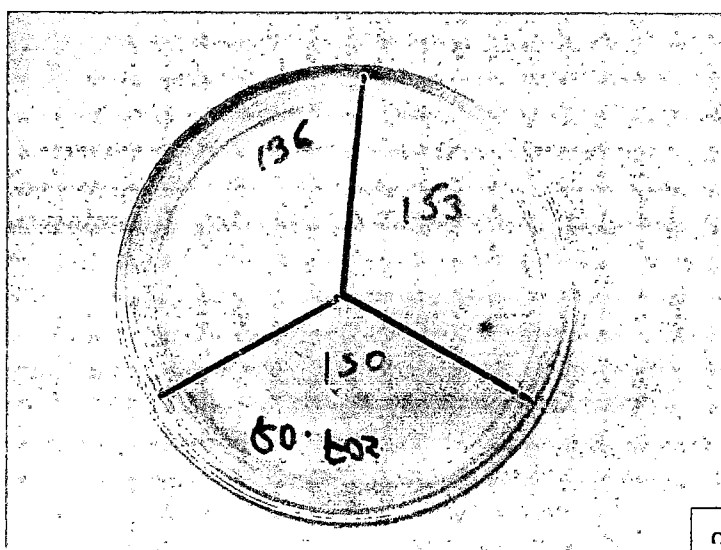
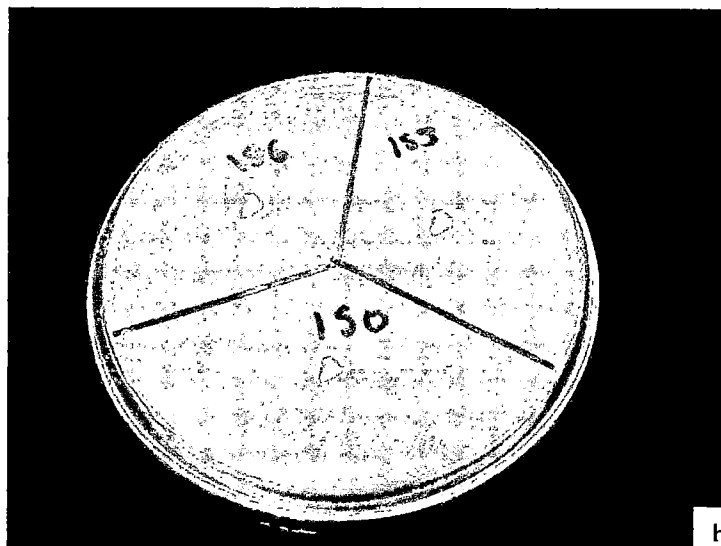
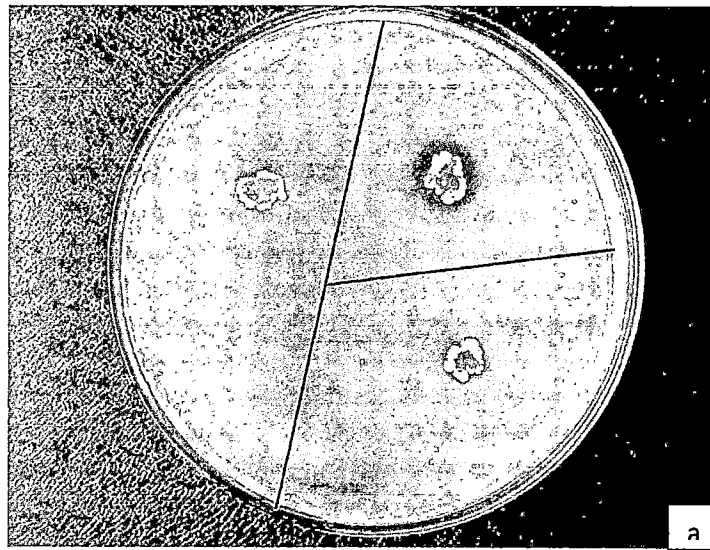
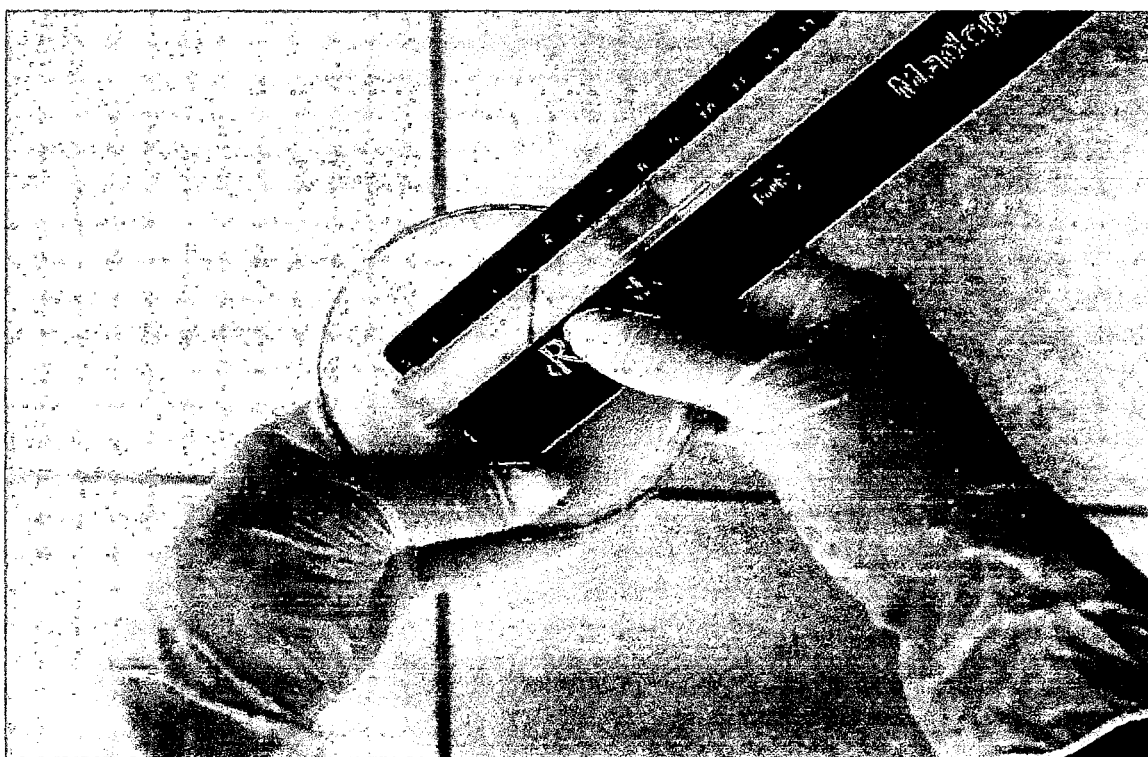


Figura 25. *Bacillus* spp. cultivados en agar NBRIP con fosfato dicálcico (a), tricálcico (b) y roca fosfórica de Bayóvar (c).



**Figura 26.** Medición del diámetro del halo de solubilización de fosfato por *Bacillus* sp.



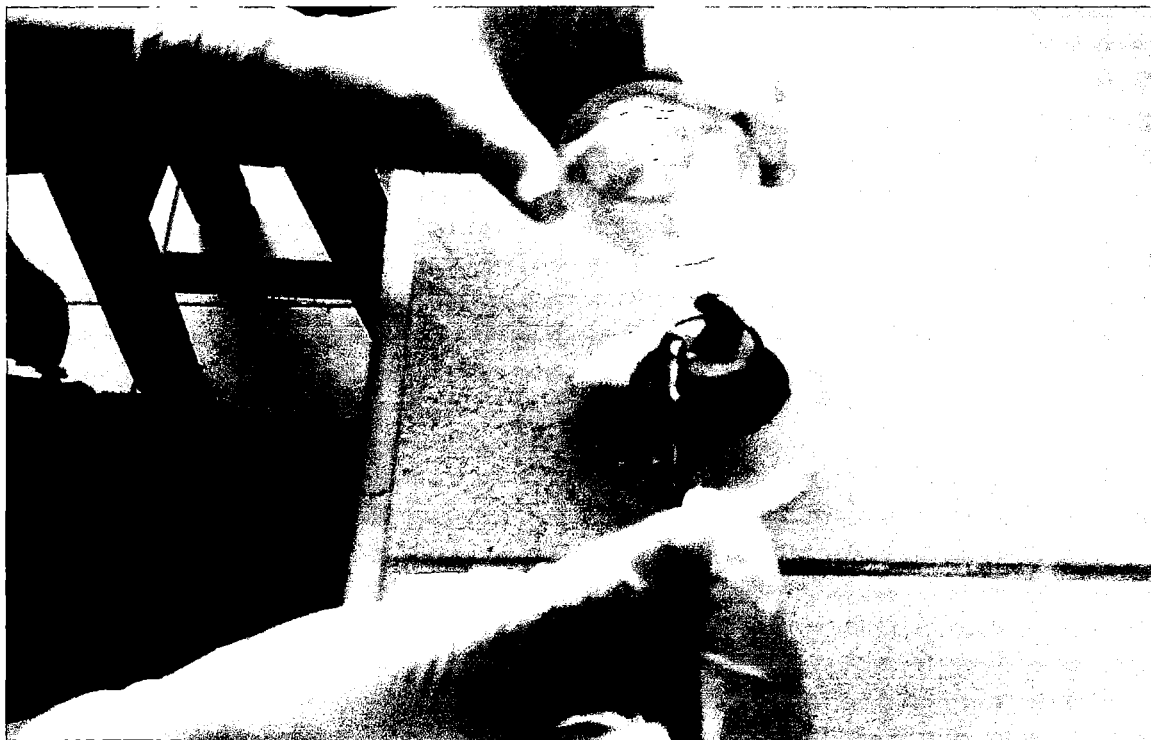
Para la cuantificación del fósforo soluble en medio líquido se seleccionó la fuente de fósforo inorgánico, con la que se alcanzó el mayor índice de solubilización.

### **3.2.8. Cuantificación de fósforo soluble en medio líquido**

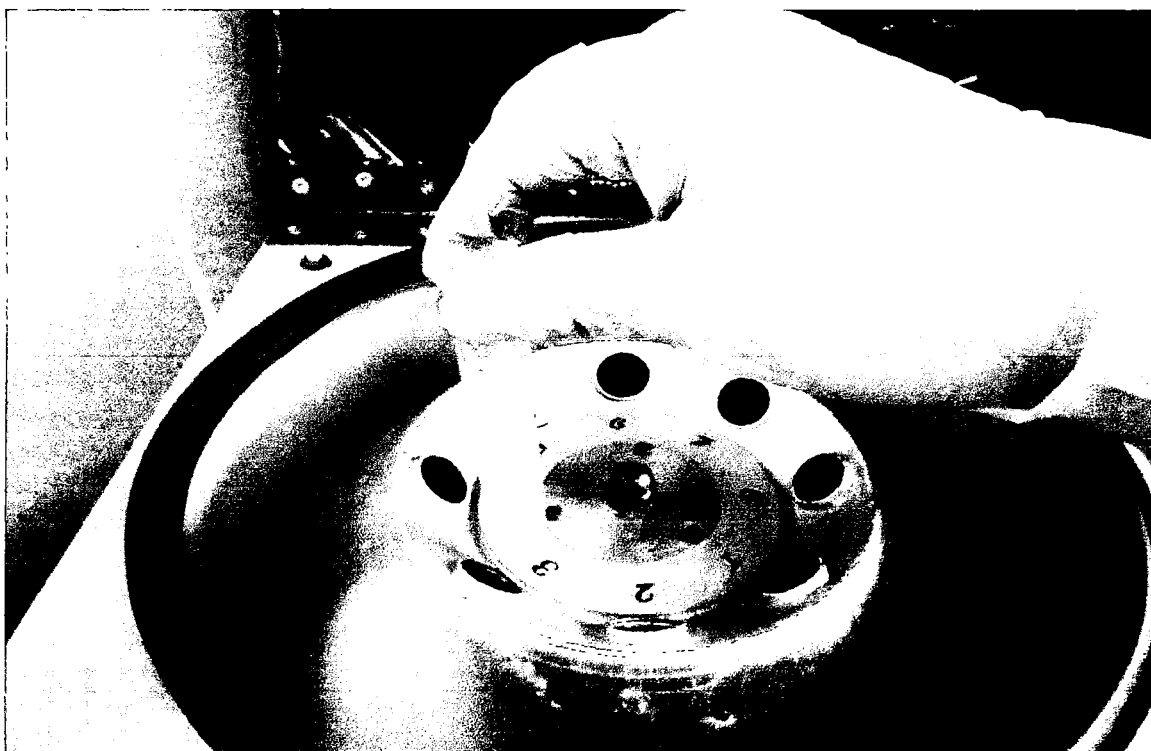
Para la cuantificación de fósforo soluble en medio líquido por *Bacillus* spp. según Vázquez *et al.* (2000), cada bacteria fue cultivada en caldo NBRIP con fosfato tricálcico, hasta alcanzar  $10^5$  ufc mL<sup>-1</sup>. A continuación, cada cultivo bacteriano fue inoculado por triplicado en frascos con 50 mL de caldo NBRIP e incubado a 30°C (Figura 27), con agitación constante (150 rpm), por 7 días. Después, se tomaron submuestras de 4 mL de caldo NBRIP que fueron centrifugadas a 3000 rpm, durante 5 minutos (Figura 28) y con el sobrenadante se cuantificó el fósforo soluble, mediante el método colorimétrico del molibdato (Rodier & Rodi, 2005). La positividad a la solubilización de fosfato se evidenció con una coloración azul (Figura 29) y se leyó la absorbancia en espectrofotómetro de luz visible, a 690nm. Las concentraciones de fósforo soluble se calcularon en una recta patrón, obtenida con diluciones sucesivas de fosfato monopotásico (Anexo 4)

### **3.2.9 Análisis de datos**

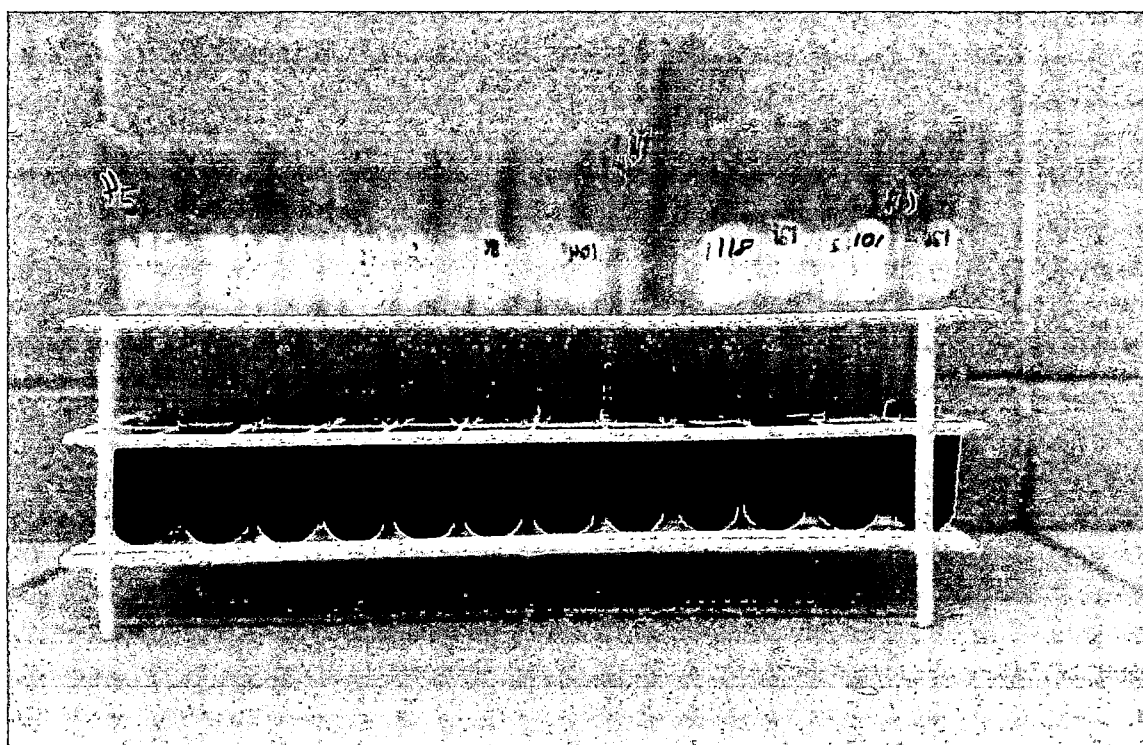
Los datos obtenidos fueron ordenados en tablas y figuras, para analizar las características de *Bacillus* spp. solubilizadoras de fosfato. Con los valores del índice de solubilización de fosfato y fósforo soluble se realizaron las pruebas de normalidad y homogeneidad de varianzas. Según los resultados, se consideró adecuado el análisis no paramétrico de Kruskal Wallis. Se utilizó el software estadísticos SPSS versión 15.0, así como los programas Microsoft Office Word 2010, Excel versión 2010 y Minitab 15.



**Figura 27.** Inoculación de *Bacillus* sp. en caldo NBRIP con fosfato tricálcico.



**Figura 28.** Centrifugación de submuestras de caldo NBRIP con fosfato tricálcico.



**Figura 29.** Coloración observada en la cuantificación de fósforo soluble por el método colorímetro del molibdato.

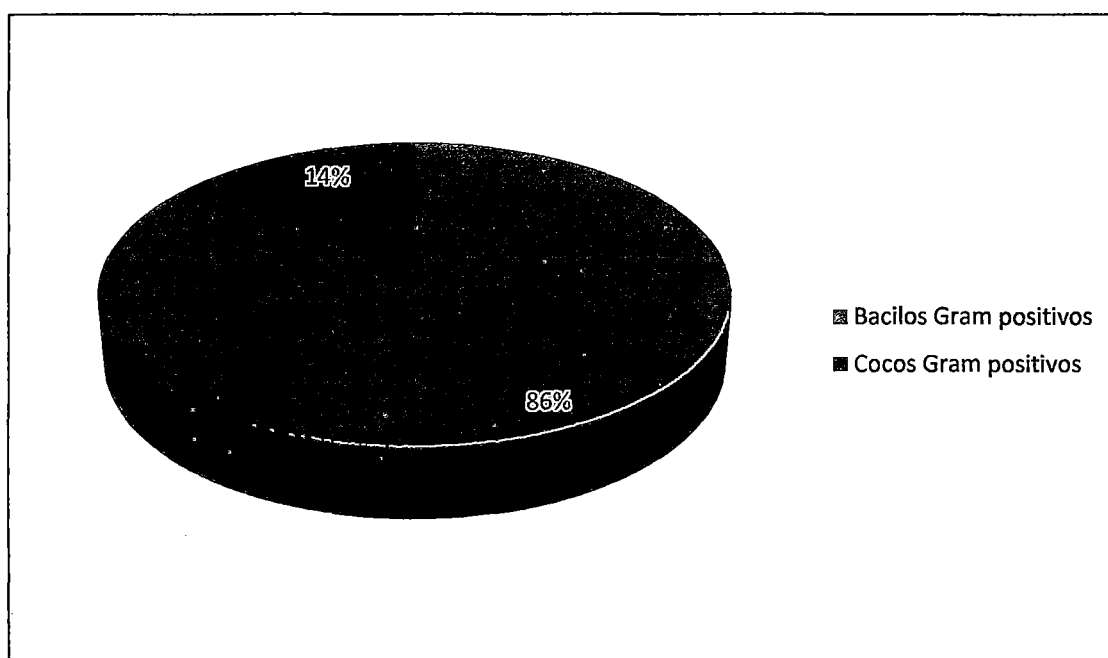
## IV. RESULTADOS

### 4.1 Bacterias termotolerantes solubilizadoras de fosfato aisladas

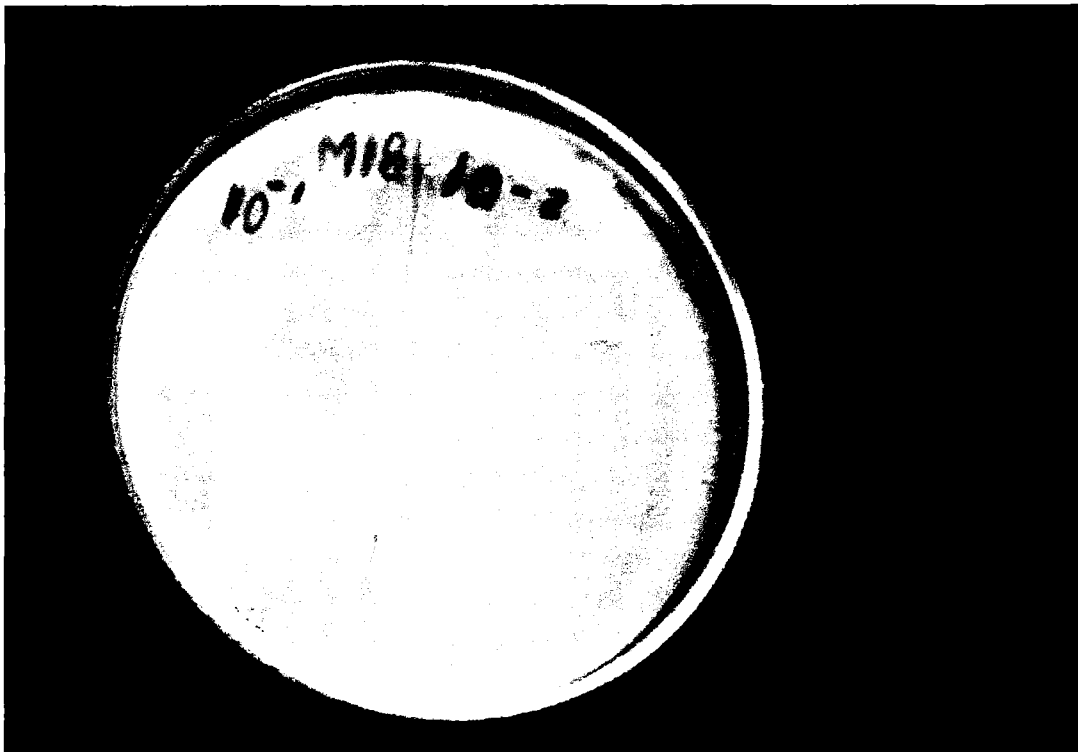
En 54 muestras de suelo rizosférico de *Zea mays* L. "maiz" se aislaron 191 bacterias termotolerantes solubilizadoras de fosfato, entre las que 85,9% (164) correspondió a bacilos Gram positivos y 14,1% (27) a cocos Gram positivos (Figura 30).

Las bacterias solubilizadoras de fosfato se aislaron en agar con fosfato insoluble como fuente de fósforo y se reconocieron por una zona transparente alrededor de la colonia (Figuras 31,32). El 74,7% (149) de las bacterias se aislaron en agar NBRIP con fosfato tricálcico y 25,3% (42) en agar SRSM con fosfato dicálcico. En ambos medios, los bacilos Gram positivos predominaron frente a los cocos (Figura 33).

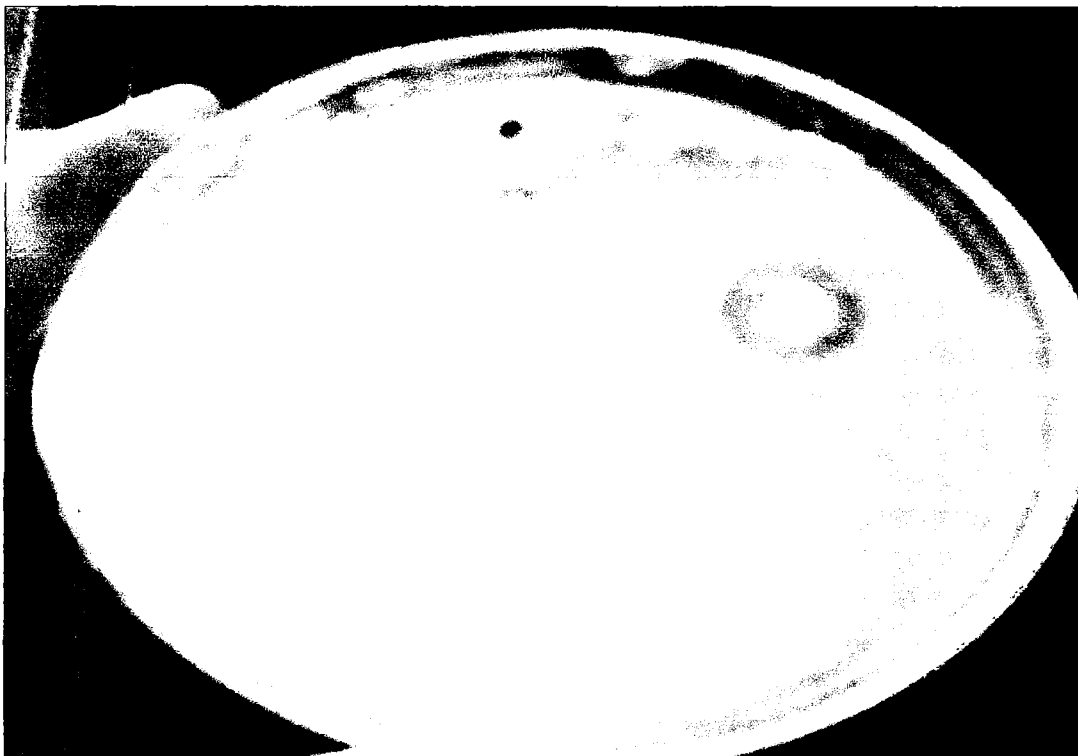
El diámetro de los halos de solubilización al aislamiento de las bacterias termotolerantes, osciló entre 1,0 y 6,0mm en agar SRSM (Tabla 3) y 1,0 y 8,0mm en agar NBRIP (Tabla 4). Después de dos subcultivos, la actividad solubilizadora de fosfato se mantuvo en todos los bacilos, observándose halos con valores máximos de 6,0 mm en agar SRSM (Tabla 4) y 8,0mm en agar NBRIP (Tabla 5); sin embargo, en algunas bacterias el diámetro disminuyó o aumentó en relación al diámetro del aislamiento (Tablas 5, 6).



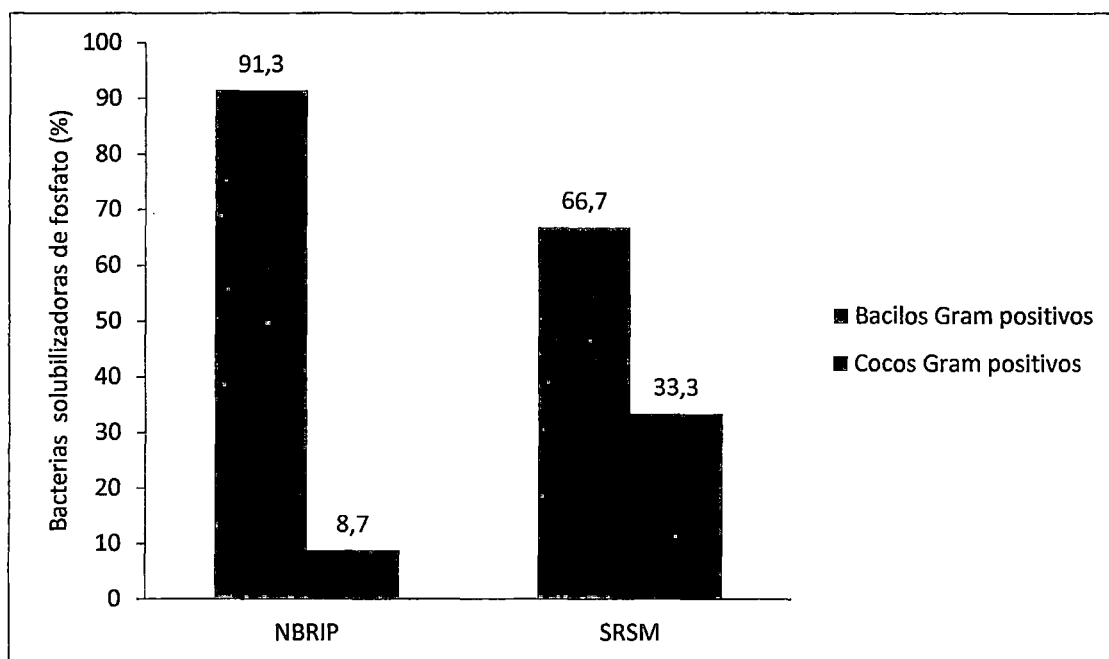
**Figura 30.** Bacterias termotolerantes solubilizadoras de fosfato aisladas de suelo rizosférico de *Zea mays* L. en Lambayeque, 2014.



**Figura 31.** Bacterias solubilizadoras de fosfato aisladas en agar NBRIP con fosfato tricálcico.



**Figura 32.** Bacterias solubilizadoras de fosfato aisladas en agar SRSM con fosfato dicálcico.



**Figura 33.** Frecuencia de bacilos y cocos solubilizadores de fosfato aislados en agar NBRIP y SRSM.

**Tabla 3.**Diámetro (mm) del halo de solubilización de fosfato de bacterias termotolerantes solubilizadoras de fosfato aisladas en agar SRSM con fosfato dicálcico

<b>Bacteria</b>	<b>Halo (mm)</b>
Bacilo 98	6,0
Coco 17	6,0
Coco 14	6,0
Coco 16	5,0
Coco 19	5,0
Bacilo 99	4,5
Bacilo 45	4,0
Bacilo 49	4,0
Coco 18	4,0
Coco 20	4,0
Coco 21	4,0
Coco 22	4,0
Coco 25	4,0
Coco 26	4,0
Coco 27	4,0
Bacilo 105	3,5
Coco 15	3,0
Bacilo 47	3,0
Bacilo 50	3,0
Bacilo 104	3,0
Bacilo 106	3,0
Coco 24	3,0
Bacilo 44	2,0
Bacilo 46	2,0
Bacilo 48	2,0
Bacilo 100	2,0
Bacilo 102	2,0
Bacilo 103	2,0
Bacilo 154	2,0
Coco 23	2,0
Bacilo 159	2,0
Bacilo 162	2,0
Bacilo 101	2,0
Bacilo 107	1,5
Bacilo 156	1,5
Bacilo 157	1,5
Bacilo 158	1,0
Bacilo 160	1,0
Bacilo 161	1,0
Bacilo164	1,0
Bacilo 155	1,0
Bacilo 163	1,0



**Tabla 4.**Diámetro (mm) del halo de solubilización de fosfato de bacterias termotolerantes solubilizadoras de fosfato aisladas en agar NBRIP con fosfato tricálcico

<b>Bacteria</b>	<b>Halo (mm)</b>	<b>Bacteria</b>	<b>Halo (mm)</b>	<b>Bacteria</b>	<b>Halo (mm)</b>
Bacilo 128	8,0	Coco 13	4,0	Bacilo 79	2,0
Coco 12	7,0	Bacilo 113	3,5	Bacilo 80	2,0
Bacilo 70	6,0	Bacilo 1	3,0	Bacilo 83	2,0
Bacilo 81	6,0	Bacilo 14	3,0	Bacilo 84	2,0
Bacilo 153	6,0	Bacilo 18	3,0	Bacilo 85	2,0
Coco 5	6,0	Bacilo 20	3,0	Bacilo 89	2,0
Coco 8	6,0	Bacilo 21	3,0	Bacilo 92	2,0
Coco 2	5,0	Bacilo 26	3,0	Bacilo 93	2,0
Bacilo 12	5,0	Bacilo 39	3,0	Bacilo 112	2,0
Bacilo 25	5,0	Coco 4	3,0	Bacilo 121	2,0
Bacilo 41	5,0	Bacilo 53	3,0	Bacilo 122	2,0
Bacilo 51	5,0	Bacilo 56	3,0	Bacilo 124	2,0
Bacilo 87	5,0	Bacilo 57	3,0	Bacilo 134	2,0
Bacilo 94	5,0	Bacilo 59	3,0	Bacilo 135	2,0
Bacilo 95	5,0	Bacilo 62	3,0	Bacilo 146	2,0
Bacilo 108	5,0	Bacilo 86	3,0	Bacilo 147	2,0
Bacilo 109	5,0	Bacilo 115	3,0	Bacilo 149	2,0
Bacilo 116	5,0	Bacilo 119	3,0	Bacilo 37	1,5
Bacilo 118	5,0	Bacilo 120	3,0	Bacilo 10	1,5
Coco 10	5,0	Bacilo 126	3,0	Bacilo 15	1,5
Bacilo 136	5,0	Bacilo 127	3,0	Bacilo 28	1,5
Bacilo 141	5,0	Bacilo 129	3,0	Bacilo 32	1,5
Bacilo 144	5,0	Bacilo 131	3,0	Bacilo 36	1,5
Bacilo 150	5,0	Bacilo 137	3,0	Bacilo 40	1,5
Bacilo 152	5,0	Bacilo 143	3,0	Bacilo 43	1,5
Bacilo 4	4,0	Bacilo 2	2,0	Bacilo 58	1,5
Bacilo 5	4,0	Bacilo 3	2,0	Bacilo 63	1,5
Coco 1	4,0	Bacilo 7	2,0	Bacilo 66	1,5
Bacilo 6	4,0	Bacilo 17	2,0	Bacilo 71	1,5
Bacilo 8	4,0	Bacilo19	2,0	Bacilo 82	1,5
Bacilo 9	4,0	Bacilo 22	2,0	Bacilo 123	1,0
Bacilo 11	4,0	Bacilo 23	2,0	Bacilo 125	1,0
Bacilo 13	4,0	Bacilo 27	2,0	Bacilo 132	1,0
Bacilo 16	4,0	Bacilo 29	2,0	Bacilo 133	1,0
Bacilo 24	4,0	Bacilo 30	2,0	Bacilo 138	1,0
Bacilo 31	4,0	Bacilo 33	2,0	Bacilo 139	1,0
Bacilo 55	4,0	Bacilo 35	2,0	Bacilo 140	1,0
Bacilo 60	4,0	Bacilo 42	2,0	Bacilo 145	1,0
Coco 7	4,0	Bacilo 52	2,0	Bacilo 148	1,0
Coco 9	4,0	Bacilo 54	2,0	Bacilo 151	1,0
Bacilo 88	4,0	Bacilo 61	2,0	Bacilo 34	1,0
Bacilo 90	4,0	Bacilo 64	2,0	Bacilo 38	1,0
Bacilo 91	4,0	Bacilo 65	2,0	Bacilo 67	1,0
Bacilo 96	4,0	Bacilo 68	2,0	Bacilo 72	1,0
Bacilo 97	4,0	Bacilo 69	2,0	Bacilo 78	1,0
Bacilo 110	4,0	Bacilo 73	2,0	Bacilo 130	1,0
Bacilo 111	4,0	Bacilo 74	2,0	Bacilo 142	1,0
Bacilo 114	4,0	Bacilo 75	2,0		

**Tabla 5.** Diámetro (mm) del halo de solubilización de fosfato de bacilos esporulados Gram positivos después de dos subcultivos en agar SRSM – fosfato dicálcico

<b>Bacilo código</b>	<b>Halo de solubilización(mm)</b>	
	<b>Subcultivo 1</b>	<b>Subcultivo 2</b>
98	6,0	6,0
50	4,0	5,0
104	4,0	5,0
106	4,0	5,0
45	5,0	4,0
46	3,0	4,0
49	5,0	4,0
99	5,5	4,0
103	3,0	4,0
159	3,0	4,0
47	4,0	3,0
100	3,0	3,0
105	4,5	3,0
107	2,0	3,0
156	2,0	3,0
157	2,0	3,0
158	2,0	3,0
160	2,0	3,0
161	2,0	3,0
164	2,0	3,0
44	3,0	2,0
48	3,0	2,0
102	3,0	2,0
154	3,0	2,0
155	1,0	2,0
162	3,0	2,0
163	1,0	2,0
101	2,0	1,0

**Tabla 6.** Diámetro (mm) del halo de solubilización de fosfato de bacilos esporulados Gram positivos después de dos subcultivos en agar NBRIP – fosfato tricálcico

<b>Bacilo código</b>	<b>Halo de solubilización(mm)</b>		<b>Bacilo código</b>	<b>Halo de solubilización(mm)</b>	
	<b>Subcultivo 1</b>	<b>Subcultivo 2</b>		<b>Subcultivo 1</b>	<b>Subcultivo 2</b>
128	8,0	8,0	91	3,0	5,0
70	6,0	7,0	96	4,0	5,0
81	6,0	7,0	97	4,0	5,0
153	6,0	7,0	110	4,0	5,0
12	5,0	6,0	111	4,0	5,0
25	5,0	6,0	114	4,0	5,0
41	5,0	6,0	117	4,0	5,0
51	4,0	6,0	113	4,0	4,5
87	5,0	6,0	1	5,0	4,0
94	5,0	6,0	14	3,0	4,0
95	7,0	6,0	18	3,0	4,0
108	5,0	6,0	20	3,0	4,0
109	5,0	6,0	21	5,0	4,0
116	5,0	6,0	26	3,0	4,0
118	5,0	6,0	39	3,0	4,0
136	5,0	6,0	53	3,0	4,0
141	5,0	6,0	56	3,0	4,0
144	7,0	6,0	57	3,0	4,0
150	5,0	6,0	59	3,0	4,0
152	7,0	6,0	62	3,0	4,0
4	4,0	5,0	86	3,0	4,0
5	3,0	5,0	115	3,0	4,0
6	4,0	5,0	119	4,0	4,0
8	4,0	5,0	120	3,0	4,0
9	6,0	5,0	126	3,0	4,0
11	4,0	5,0	127	3,0	4,0
13	4,0	5,0	129	3,0	4,0
16	4,0	5,0	131	3,0	4,0
24	4,0	5,0	137	3,0	4,0
31	4,0	5,0	143	5,0	4,0
55	4,0	5,0	2	4,0	3,0
60	4,0	5,0	3	3,0	3,0
88	4,0	5,0	7	2,0	3,0
90	4,0	5,0	17	2,0	3,0

Continuación....

<b>Bacilo Código</b>	<b>Halo de solubilización(mm)</b>		<b>Bacilo código</b>	<b>Halo de solubilización(mm)</b>	
	<b>Subcultivo 1</b>	<b>Subcultivo 2</b>		<b>Subcultivo 1</b>	<b>Subcultivo 2</b>
19	2,0	3,0	135	2,0	3,0
22	2,0	3,0	146	2,0	3,0
23	2,0	3,0	147	2,0	3,0
27	2,0	3,0	149	4,0	3,0
29	2,0	3,0	37	2,0	2,5
30	2,0	3,0	10	1,0	2,0
33	2,0	3,0	15	1,0	2,0
35	2,0	3,0	28	1,0	2,0
42	2,0	3,0	32	1,0	2,0
52	2,0	3,0	36	1,0	2,0
54	2,0	3,0	40	1,0	2,0
61	2,0	3,0	43	3,0	2,0
64	2,0	3,0	58	1,0	2,0
65	2,0	3,0	63	1,0	2,0
68	4,0	3,0	66	1,0	2,0
69	4,0	3,0	71	1,0	2,0
73	4,0	3,0	82	1,0	2,0
74	4,0	3,0	123	1,0	2,0
75	3,0	3,0	125	1,0	2,0
76	2,0	3,0	132	1,0	2,0
77	2,0	3,0	133	1,0	2,0
79	4,0	3,0	138	1,0	2,0
80	4,0	3,0	139	1,0	2,0
83	2,0	3,0	140	3,0	2,0
84	4,0	3,0	145	1,0	2,0
85	2,0	3,0	148	1,0	2,0
89	2,0	3,0	151	1,0	2,0
92	2,0	3,0	34	1,0	1,5
93	2,0	3,0	38	2,0	1,0
112	2,0	3,0	67	2,0	1,0
121	2,0	3,0	72	2,0	1,0
122	2,0	3,0	78	2,0	1,0
124	2,0	3,0	130	2,0	1,0
134	2,0	3,0	142	2,0	1,0

## 4.2 Especies de *Bacillus* identificadas

Los 164 cultivos de bacilos esporulados fueron agrupados según el borde y consistencia de las colonias, así como la posición de la esporas. Se obtuvieron ocho morfotipos, con frecuencias que oscilaron entre 3 y 31% y predominó el morfotipo 1 con bordes irregulares, consistencia seca y espora central (Tabla 7). La caracterización fenotípica identificó *B. circulans* (31%), *B. lentus* (20%), *B. firmus* (16%), *B. cereus* (13%), *B. sphaericus* (7%), *B. subtilis* (6%), *B. licheniformis* (4%) y *B. brevis* con 3% (Tablas 8,9).

## 4.3 Índice de solubilización en agar NBRIP con tres fuentes de fósforo inorgánico

En medio sólido con fosfato dicálcico y tricalcico se observaron halos de solubilización por *Bacillus* spp. calculándose el área y el índice de solubilización. Con roca fosforica de Bayóvar, las bacterias formaron colonias, pero no zonas transparentes alrededor (Figuras 34,35,36).

El área de solubilización de fosfato dicálcico osciló entre 0,79 mm<sup>2</sup> con *B. cereus* 142 y 28,26 mm<sup>2</sup> con *B. subtilis* 90 (Anexo 5). El 51,8% de los cultivos de *Bacillus* spp. alcanzó un rango de 0,1-5,0 mm<sup>2</sup> y el 0,6% un área mayor a 25 mm<sup>2</sup> (Tabla 10). El área de solubilización de fosfato tricálcico osciló entre 0,79 mm<sup>2</sup> con *B. lentus* 78 y 50,24 mm<sup>2</sup> con *B. cereus* 128 (Anexo 6). El 19,6% de *Bacillus* spp. alcanzó un rango de 0,1-5,0 mm<sup>2</sup> y el 14,6% un área mayor de 25 mm<sup>2</sup> (Tabla 11).

El índice de solubilización, IS, de fosfato dicálcico osciló entre 1,08 con *B. circulans* 63 y 3,0 con *B. sphaericus* 6 (Anexo 7). El 25,6% de los cultivos de *Bacillus* spp. alcanzó un rango de 1,0-1,3 y el 0,6% un IS mayor de 2,5 (Tabla 12). El IS de fosfato tricálcico osciló entre 1,09 con *B. lentus* 78 y 3,0 con *B. circulans* 95 (Anexo 8 ). El 13,4% de las bacterias alcanzó un rango de 1,0-1,3 y el 6,1% un IS mayor de 2,5 (Tabla 13 ).

**Tabla 7.** Características y frecuencia de morfotipos de *Bacillus* spp. aislados de suelo rizosférico de *Zea mays* L. en Lambayeque, 2014

Morfotipo	Colonia		Célula	Frecuencia	
	Borde	Consistencia	Espora	Nº	%
1	Irregular	Seca	Central	51	31
2	Irregular	Pastosa	Central	32	20
3	Irregular	Pastosa	Subterminal	26	16
4	Irregular	Mucoide	Central	21	13
5	Entero	Pastosa	Subterminal	12	7
6	Irregular	Mucoide	Subterminal	10	6
7	Irregular	Seca	Subterminal	7	4
8	Entero	Pastosa	Central	5	3
Total				164	100

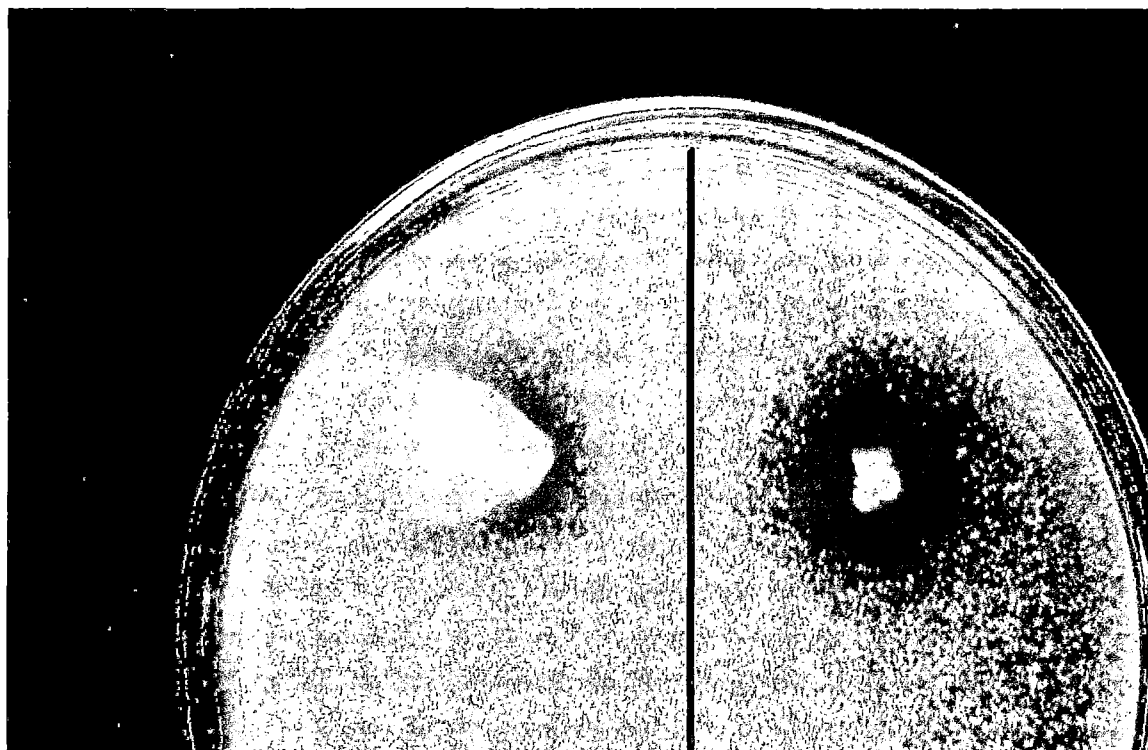


**Tabla 8.** Características diferenciales de especies de *Bacillus* solubilizadoras de fosfato, identificadas en suelo rizosférico de *Zea mays* L. en Lambayeque, 2014

<i>Bacillus</i> spp.	Prueba de catalasa	Utilización de citrato	Voges Proskauer	Acidez				Hidrólisis	
				Glucosa	Arabinosa	Manitol	Xilosa	Almidón	Lecitina
<i>B. circulans</i>	+	-	-	+	+	-	+	+	V
<i>B. lentus</i>	+	V	-	+	+	+	+	+	-
<i>B. firmus</i>	+	-	-	+	-	+	V	+	-
<i>B. cereus</i>	+	-	-	+	-	-	-	+	+
<i>B. sphaericus</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>B. subtilis</i>	+	+	+	+	+	-	+	+	-
<i>B. licheniformis</i>	+	+	-	+	-	+	+	+	-
<i>B. brevis</i>	+	+	-	+	-	V	-	+	-

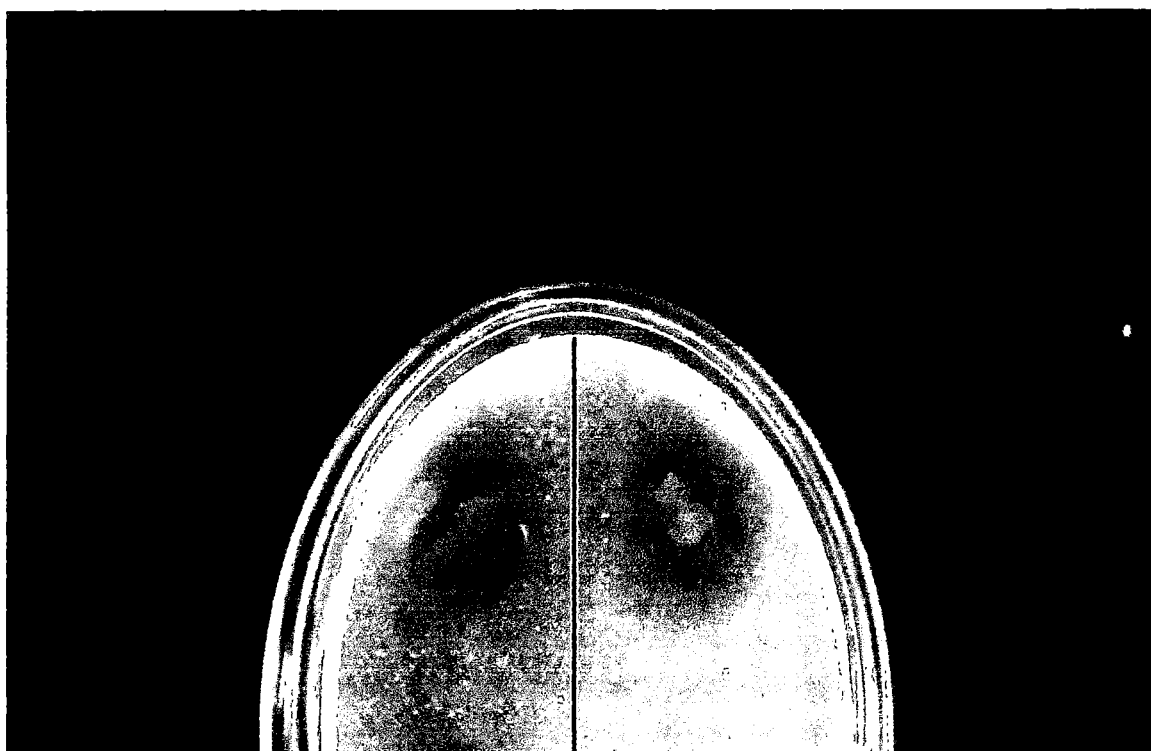
**Tabla 9.** Frecuencia de especies de *Bacillus* solubilizadoras de fosfato, identificadas en suelo rizosférico de *Zea mays* L. en Lambayeque, 2014

<i>Bacillus</i> spp.	Cultivos	
	N°	%
<i>Bacillus circulans</i>	31	31
<i>Bacillus lentus</i>	20	20
<i>Bacillus firmus</i>	16	16
<i>Bacillus cereus</i>	13	13
<i>Bacillus sphaericus</i>	7	7
<i>Bacillus subtilis</i>	6	6
<i>Bacillus licheniformis</i>	4	4
<i>Bacillus brevis</i>	3	3
Total	100	100

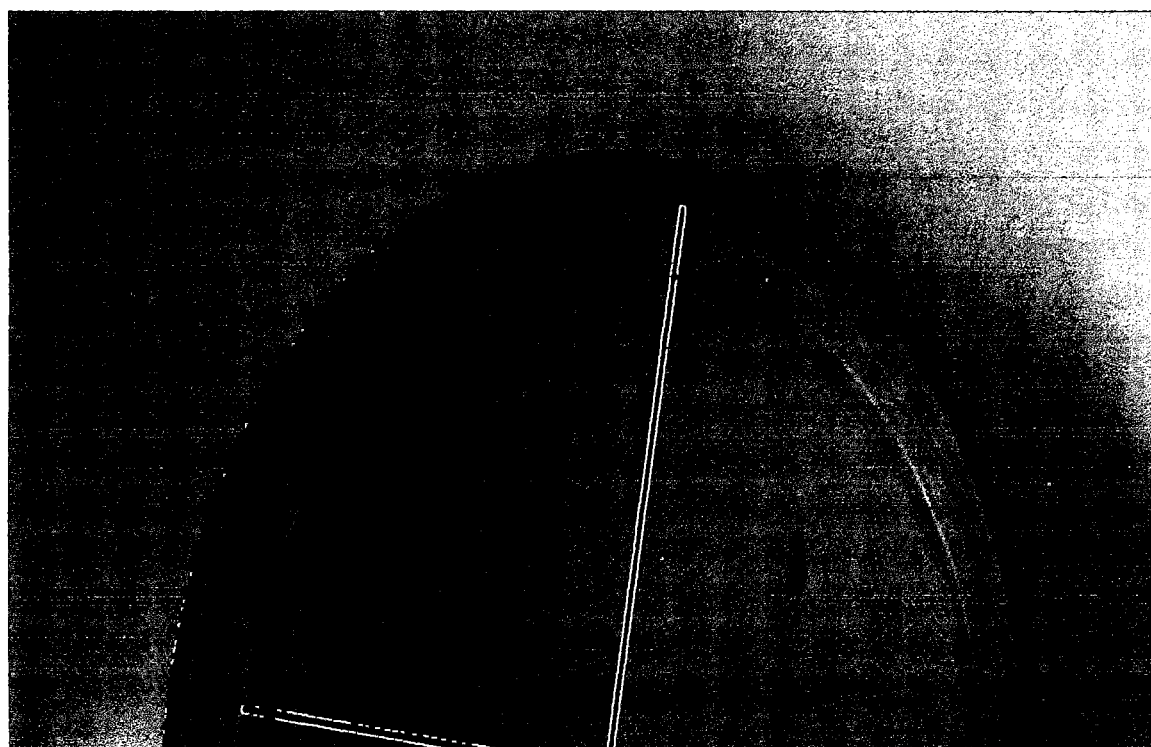


**Figura 34.** Halos de solubilización de fosfato por *Bacillus* spp. en agar NBRIP con fosfato dicálcico.





**Figura 35.** Halos de solubilización de fosfato por *Bacillus* spp. en agar NBRIP con fosfato tricálcico.



**Figura 36.** Colonias de *Bacillus* spp. en agar NBRIP con roca fosfórica de Bayovar.

**Tabla 10.** Rango del área de solubilización (mm<sup>2</sup>) por *Bacillus* spp. nativas en agar NBRIP – fosfato dicálcico

Área de solubilización (rango mm <sup>2</sup> )	Cultivos de <i>Bacillus</i> spp.	
	Nº	%
0,1 – 5,0	85	51,8
5,1 - 10,0	41	25,0
10,1 – 15,0	30	18,3
15,1 – 20,0	7	4,3
20,1 – 25,0	0	0,0
>25	1	0,6

**Tabla 11.** Rango del área de solubilización (mm<sup>2</sup>) por *Bacillus* spp. nativas en agar NBRIP – fosfato tricálcico

Área de solubilización (rango mm <sup>2</sup> )	Cultivos de <i>Bacillus</i> spp.	
	Nº	%
0,1 – 5,0	32	19,6
5,1 - 10,0	53	32,3
10,1 – 15,0	29	17,7
15,1 – 20,0	25	15,2
20,1 – 25,0	1	0,6
>25	24	14,6

**Tabla 12.** Rango del índice de solubilización por *Bacillus* spp. nativas en agar NBRIP – fosfato dicálcico

Índice de solubilización (rango)	Cultivos de <i>Bacillus</i> spp.	
	Nº	%
1,0 – 1,30	42	25,6
1,31 - 1,60	70	42,7
1,61 – 1,90	30	18,3
1,91 – 2,20	15	9,1
2,21 – 2,50	6	3,7
>2,50	1	0,6

**Tabla 13.** Rango del índice de solubilización por *Bacillus* spp. nativas en agar NBRIP – fosfato tricálcico

Índice de solubilización (rango)	Cultivos de <i>Bacillus</i> spp.	
	Nº	%
1,0 – 1,30	22	13,4
1,31 - 1,60	53	32,3
1,61 – 1,90	29	17,7
1,91 – 2,20	29	17,7
2,21 – 2,50	21	12,8
>2,50	10	6,1

Los valores del índice de solubilización de fosfato tricálcico no presentaron distribución normal (Tabla 14). La prueba no paramétrica de Kruskal – Wallis (Anexo 9), demostró que el mayor valor de 3,0 se alcanzó con *B. circulans* 95, *B. subtilis* 94 y *B. lentus* 59 (Tabla 15).

#### **4.4 Fósforo soluble en medio NBRIP líquido**

El fósforo soluble en medio NBRIP líquido cultivado con *Bacillus* spp. osciló entre 0,92 ppm *B. cereus* 151 y 8,6 ppm con *B. firmus* 36 (Anexo 10). El 7,9% de las bacterias alcanzó un rango de 0,1-2,0 ppm y el 1,2% más de 8,0 ppm de fósforo soluble (Tabla 16). Los valores de fósforo soluble no presentaron distribución normal (Tabla 17) y la prueba no paramétrica de Kruskal – Wallis (Anexo 11), demostró que el mayor valor de 8,6 ppm se alcanzó *B. firmus* 36 (Tabla 18).

Las bacterias seleccionadas por alcanzar los mayores índices de solubilización en medio sólido, no correspondieron a los mayores valores de concentración de fósforo soluble en medio líquido y viceversa (Tablas 19, 20).

**Tabla 14.** Análisis de la varianza (SC tipo III) del índice de solubilización de fosfato por *Bacillus* spp. aislada de la rizosféra de *Zea mays* L.

<b>F.V.</b>	<b>SC</b>	<b>gl</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>p-valor</b>
Modelo	101,12	163	0,62	85,97	< 0,0001
Mm	101,12	163	0,62	85,97	< 0,0001
Error	2,37	328	0,01		
Total	103,49	491			

**Tabla 15.** Prueba de Kruskal - Wallis del índice de solubilización de fosfato por *Bacillus* spp. aisladas de la rizosfera de *Zea mays* L.

Tratamientos	IS	Significancia	Tratamientos	IS	Significancia
<i>B. circulans</i> 95	3,00	a	<i>B. lentus</i> 41	2,00	abcdefghijkl
<i>B. subtilis</i> 94	3,00	a	<i>B. firmus</i> 144	2,00	abcdefghijklm
<i>B. lentus</i> 59	3,00	a	<i>B. circulans</i> 51	2,00	abcdefghijklmn
<i>B. sphaericus</i> 108	2,90	ab	<i>B. lentus</i> 12	2,00	abcdefghijklmn
<i>B. firmus</i> 104	2,90	ab	<i>B. lentus</i> 24	2,00	abcdefghijklmn
<i>B. firmus</i> 141	2,90	ab	<i>B. lentus</i> 52	2,00	abcdefghijklmn
<i>B. subtilis</i> 90	2,90	ab	<i>B. cereus</i> 92	2,00	abcdefghijklmn
<i>B. cereus</i> 93	2,75	abc	<i>B. cereus</i> 89	2,00	abcdefghijklmn
<i>B. brevis</i> 116	2,73	abc	<i>B. subtilis</i> 97	2,00	abcdefghijklmn
<i>B. firmus</i> 55	2,67	abcd	<i>B. lentus</i> 150	2,00	abcdefghijklmno
<i>B. brevis</i> 106	2,65	abcd	<i>B. circulans</i> 4	2,00	abcdefghijklmno
<i>B. brevis</i> 113	2,65	abcd	<i>B. lentus</i> 16	2,00	abcdefghijklmno
<i>B. subtilis</i> 109	2,53	abcd	<i>B. lentus</i> 83	2,00	abcdefghijklmnop
<i>B. circulans</i> 81	2,46	abcde	<i>B. sphaericus</i> 110	2,00	abcdefghijklmnop
<i>B. firmus</i> 143	2,45	abcde	<i>B. licheniformis</i> 114	2,00	abcdefghijklmnop
<i>B. cereus</i> 45	2,42	abcde	<i>B. sphaericus</i> 6	2,00	abcdefghijklmnop
<i>B. sphaericus</i> 57	2,38	abcdef	<i>B. cereus</i> 26	2,00	abcdefghijklmnop
<i>B. cereus</i> 96	2,38	abcdef	<i>B. sphaericus</i> 46	2,00	abcdefghijklmnop
<i>B. cereus</i> 153	2,38	abcdef	<i>B. circulans</i> 54	1,83	abcdefghijklmnop
<i>B. circulans</i> 87	2,37	abcdef	<i>B. cereus</i> 117	1,80	abcdefghijklmnop
<i>B. cereus</i> 111	2,34	abcdefg	<i>B. licheniformis</i> 128	1,80	abcdefghijklmnop
<i>B. subtilis</i> 99	2,28	abcdefg	<i>B. subtilis</i> 101	1,80	abcdefghijklmnop
<i>B. sphaericus</i> 58	2,27	abcdefg	<i>B. sphaericus</i> 115	1,80	abcdefghijklmnopq
<i>B. circulans</i> 56	2,27	abcdefgh	<i>B. cereus</i> 103	1,80	abcdefghijklmnopq
<i>B. circulans</i> 100	2,25	abcdefghi	<i>B. firmus</i> 131	1,80	abcdefghijklmnopqr
<i>B. firmus</i> 107	2,24	abcdefghij	<i>B. cereus</i> 112	1,80	abcdefghijklmnopqr
<i>B. cereus</i> 118	2,17	abcdefghijk	<i>B. circulans</i> 127	1,80	abcdefghijklmnopqr
<i>B. firmus</i> 53	2,17	abcdefghijk	<i>B. circulans</i> 23	1,80	abcdefghijklmnopqr
<i>B. subtilis</i> 86	2,17	abcdefghijk	<i>B. lentus</i> 44	1,80	abcdefghijklmnopqr
<i>B. circulans</i> 91	2,13	abcdefghijk	<i>B. circulans</i> 21	1,80	abcdefghijklmnopqr
<i>B. lentus</i> 13	2,13	abcdefghijk	<i>B. firmus</i> 42	1,78	abcdefghijklmnopqr
<i>B. circulans</i> 47	2,13	abcdefghijk	<i>B. lentus</i> 38	1,75	abcdefghijklmnopqr
<i>B. firmus</i> 9	2,13	abcdefghijk	<i>B. lentus</i> 137	1,75	abcdefghijklmnopqr
<i>B. firmus</i> 105	2,13	abcdefghijk	<i>B. circulans</i> 14	1,75	abcdefghijklmnopqr
<i>B. lentus</i> 11	2,13	abcdefghijk	<i>B. cereus</i> 5	1,75	abcdefghijklmnopqrs
<i>B. subtilis</i> 88	2,10	abcdefghijkl	<i>B. firmus</i> 36	1,75	abcdefghijklmnopqrst
<i>B. subtilis</i> 129	2,10	abcdefghijkl	<i>B. cereus</i> 120	1,75	bcdefghijklmnopqrstu
<i>B. firmus</i> 98	2,10	abcdefghijkl	<i>B. firmus</i> 136	1,75	bcdefghijklmnopqrstuv
<i>B. firmus</i> 50	2,10	abcdefghijkl	<i>B. firmus</i> 140	1,75	cdefghijklmnopqrstuv
<i>B. brevis</i> 102	2,10	abcdefghijkl	<i>B. cereus</i> 119	1,71	cdefghijklmnopqrstuv
<i>B. circulans</i> 152	2,10	abcdefghijkl	<i>B. firmus</i> 8	1,71	cdefghijklmnopqrstuv

Continuación...

Tratamientos	I S	Significancia	Tratamientos	I S	Significancia
<i>B. licheniformis</i> 22	1,71	defghijklmnopqrstuv	<i>B. licheniformis</i> 155	1,40	nopqrstuvw
<i>B. lentus</i> 85	1,67	defghijklmnopqrstuv	<i>B. cereus</i> 79	1,38	opqrstuvw
<i>B. circulans</i> 135	1,67	defghijklmnopqrstuv	<i>B. cereus</i> 62	1,38	opqrstuvw
<i>B. cereus</i> 32	1,67	defghijklmnopqrstuv	<i>B. cereus</i> 64	1,38	opqrstuvw
<i>B. circulans</i> 43	1,67	defghijklmnopqrstuv	<i>B. circulans</i> 17	1,33	opqrstuvw
<i>B. firmus</i> 123	1,66	efghijklmnopqrstuvw	<i>B. sphaericus</i> 65	1,33	opqrstuvw
<i>B. firmus</i> 134	1,63	efghijklmnopqrstuvw	<i>B. sphaericus</i> 122	1,33	pqrstuvw
<i>B. circulans</i> 149	1,60	efghijklmnopqrstuvw	<i>B. licheniformis</i> 142	1,33	pqrstuvw
<i>B. lentus</i> 40	1,60	efghijklmnopqrstuvw	<i>B. lentus</i> 68	1,33	pqrstuvw
<i>B. circulans</i> 33	1,60	efghijklmnopqrstuvw	<i>B. subtilis</i> 146	1,33	pqrstuvw
<i>B. cereus</i> 28	1,60	efghijklmnopqrstuvw	<i>B. sphaericus</i> 154	1,33	pqrstuvw
<i>B. circulans</i> 19	1,60	efghijklmnopqrstuvw	<i>B. lentus</i> 133	1,33	pqrstuvw
<i>B. cereus</i> 31	1,60	fghijklmnopqrstuvw	<i>B. brevis</i> 3	1,33	pqrstuvw
<i>B. circulans</i> 1	1,60	fghijklmnopqrstuvw	<i>B. firmus</i> 159	1,33	qrstuvw
<i>B. lentus</i> 77	1,60	fhijklmnopqrstuvw	<i>B. circulans</i> 72	1,33	qrstuvw
<i>B. Circulans</i> 48	1,60	hijklmnopqrstuvw	<i>B. lentus</i> 82	1,33	rstuvw
<i>B. Circulans</i> 84	1,57	hijklmnopqrstuvw	<i>B. circulans</i> 73	1,33	rstuvw
<i>B. firmus</i> 147	1,57	hijklmnopqrstuvw	<i>B. circulans</i> 27	1,33	rstuvw
<i>B. firmus</i> 49	1,56	hijklmnopqrstuvw	<i>B. circulans</i> 69	1,33	rstuvw
<i>B. circulans</i> 20	1,50	ijklmnopqrstuvw	<i>B. circulans</i> 15	1,30	rstuvw
<i>B. lentus</i> 18	1,50	ijklmnopqrstuvw	<i>B. circulans</i> 161	1,30	rstuvw
<i>B. circulans</i> 37	1,50	ijklmnopqrstuvw	<i>B. lentus</i> 10	1,30	rstuvw
<i>B. lentus</i> 70	1,50	jklmnopqrstuvw	<i>B. firmus</i> 34	1,29	rstuvw
<i>B. lentus</i> 25	1,50	klmnopqrstuvw	<i>B. cereus</i> 61	1,29	rstuvw
<i>B. lentus</i> 35	1,50	klmnopqrstuvw	<i>B. lentus</i> 75	1,29	Stuvw
<i>B. licheniformis</i> 126	1,50	lmnopqrstuvw	<i>B. sphaericus</i> 125	1,29	tuvw
<i>B. lentus</i> 30	1,50	mnopqrstuvw	<i>B. lentus</i> 160	1,29	tuvw
<i>B. circulans</i> 39	1,50	mnopqrstuvw	<i>B. circulans</i> 164	1,25	tuvw
<i>B. lentus</i> 7	1,50	mnopqrstuvw	<i>B. circulans</i> 63	1,25	tuvw
<i>B. circulans</i> 139	1,50	mnopqrstuvw	<i>B. circulans</i> 158	1,25	tuvw
<i>B. licheniformis</i> 60	1,50	mnopqrstuvw	<i>B. firmus</i> 157	1,22	uvw
<i>B. circulans</i> 29	1,50	mnopqrstuvw	<i>B. circulans</i> 66	1,22	uvw
<i>B. circulans</i> 2	1,50	mnopqrstuvw	<i>B. circulans</i> 156	1,22	vw
<i>B. lentus</i> 74	1,50	nopqrstuvw	<i>B. circulans</i> 138	1,20	vw
<i>B. circulans</i> 76	1,50	nopqrstuvw	<i>B. lentus</i> 148	1,20	vw
<i>B. circulans</i> 162	1,44	nopqrstuvw	<i>B. circulans</i> 71	1,20	vw
<i>B. circulans</i> 124	1,43	nopqrstuvw	<i>B. circulans</i> 132	1,20	vw
<i>B. circulans</i> 121	1,43	nopqrstuvw	<i>B. sphaericus</i> 163	1,20	vw
<i>B. circulans</i> 130	1,43	nopqrstuvw	<i>B. firmus</i> 151	1,18	w
<i>B. lentus</i> 80	1,40	nopqrstuvw	<i>B. firmus</i> 67	1,10	w
<i>B. circulans</i> 145	1,40	nopqrstuvw	<i>B. lentus</i> 78	1,09	w

**Tabla 16.** Rango de fósforo soluble en caldo NBRIP cultivado con *Bacillus* spp.

Fósforo soluble (rango ppm)	Cultivos de <i>Bacillus</i> spp.	
	Nº	%
0,1 – 2,0	13	7,9
2,1 - 4,0	50	30,5
4,1 – 6,0	80	48,8
6,1 – 8,0	19	11,6
>8,0	2	1,2

**Tabla 17.** Análisis de la varianza (SC tipo III) de fósforo soluble en caldo NBRIP cultivado con *Bacillus* spp. aislada de la rizosféra de *Zea mays* L.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1242,34	163	7,62	1056,26	< 0,0001
Mm	1242,34	163	7,62	1056,26	< 0,0001
Error	2,37	328	0,01		
Total	1244,71	491			

**Tabla 18.** Prueba de Kruskal - Wallis de fósforo soluble en caldo NBRIP cultivado con *Bacillus* spp. aisladas de la rizosfera de *Zea mays* L.

Tratamientos	P (ppm)	Significancia	Tratamientos	P (ppm)	Significancia
<i>B. firmus</i> 36	8,60	a	<i>B. lentus</i> 80	5,51	abcdefghijklmn
<i>B. firmus</i> 53	8,49	ab	<i>B. circulans</i> 23	5,44	abcdefghijklmno
<i>B. firmus</i> 105	7,69	abc	<i>B. licheniformis</i> 126	5,43	abcdefghijklmno
<i>B. sphaericus</i> 6	7,68	abc	<i>B. circulans</i> 87	5,42	abcdefghijklmnop
<i>B. subtilis</i> 99	7,41	abcd	<i>B. firmus</i> 107	5,42	abcdefghijklmnop
<i>B. circulans</i> 91	7,10	abcde	<i>B. sphaericus</i> 115	5,41	abcdefghijklmnop
<i>B. cereus</i> 45	7,00	abcdef	<i>B. lentus</i> 13	5,41	abcdefghijklmnop
<i>B. firmus</i> 98	7,00	abcdef	<i>B. firmus</i> 143	5,40	abcdefghijklmnopq
<i>B. firmus</i> 55	6,60	abcdefg	<i>B. lentus</i> 150	5,39	abcdefghijklmnopq
<i>B. circulans</i> 81	6,49	abcdefgh	<i>B. circulans</i> 56	5,38	abcdefghijklmnopqr
<i>B. subtilis</i> 97	6,49	abcdefgh	<i>B. firmus</i> 50	5,38	abcdefghijklmnopqrs
<i>B. circulans</i> 37	6,40	abcdefgh	<i>B. subtilis</i> 129	5,41	abcdefghijklmnopqrs
<i>B. lentus</i> 12	6,34	abcdefghi	<i>B. brevis</i> 113	5,34	abcdefghijklmnopqrst
<i>B. cereus</i> 89	6,29	abcdefghij	<i>B. firmus</i> 141	5,27	abcdefghijklmnopqrstu
<i>B. circulans</i> 19	6,27	abcdefghij	<i>B. circulans</i> 29	5,26	abcdefghijklmnopqrstuv
<i>B. lentus</i> 35	6,27	abcdefghij	<i>B. subtilis</i> 88	5,25	abcdefghijklmnopqrstuv
<i>B. circulans</i> 14	6,27	abcdefghij	<i>B. lentus</i> 10	5,22	abcdefghijklmnopqrstuv
<i>B. licheniformis</i> 60	6,24	abcdefghij	<i>B. circulans</i> 4	5,21	abcdefghijklmnopqrstuvw
<i>B. cereus</i> 31	6,21	abcdefghij	<i>B. cereus</i> 28	5,13	abcdefghijklmnopqrstuvw
<i>B. cereus</i> 117	6,11	abcdefghijk	<i>B. cereus</i> 119	5,15	abcdefghijklmnopqrstuvw
<i>B. circulans</i> 100	6,06	abcdefghijk	<i>B. lentus</i> 44	5,08	abcdefghijklmnopqrstuvw
<i>B. circulans</i> 39	5,99	abcdefghijkl	<i>B. circulans</i> 135	4,97	abcdefghijklmnopqrstuvwxy
<i>B. cereus</i> 96	5,96	abcdefghijklm	<i>B. lentus</i> 18	4,96	abcdefghijklmnopqrstuvwxy
<i>B. lentus</i> 16	5,96	abcdefghijklm	<i>B. lentus</i> 41	4,94	abcdefghijklmnopqrstuvwxy
<i>B. circulans</i> 27	5,93	abcdefghijklm	<i>B. cereus</i> 92	4,93	abcdefghijklmnopqrstuvwxy
<i>B. lentus</i> 25	5,88	abcdefghijklm	<i>B. lentus</i> 52	4,92	abcdefghijklmnopqrstuvwxy
<i>B. lentus</i> 24	5,9	abcdefghijklm	<i>B. licheniformis</i> 128	4,90	abcdefghijklmnopqrstuvwxy
<i>B. lentus</i> 70	5,88	abcdefghijklm	<i>B. circulans</i> 51	4,86	abcdefghijklmnopqrstuvwxyA
<i>B. circulans</i> 63	5,82	abcdefghijklm	<i>B. brevis</i> 3	4,86	abcdefghijklmnopqrstuvwxyA
<i>B. circulans</i> 76	5,71	abcdefghijklm	<i>B. cereus</i> 120	4,79	abcdefghijklmnopqrstuvwxyAB
<i>B. firmus</i> 136	5,7	abcdefghijklm	<i>B. circulans</i> 43	4,77	abcdefghijklmnopqrstuvwxyAB
<i>B. firmus</i> 144	5,69	abcdefghijklm	<i>B. licheniformis</i> 22	4,77	abcdefghijklmnopqrstuvwxyAB
<i>B. circulans</i> 2	5,67	abcdefghijklm	<i>B. circulans</i> 152	4,76	abcdefghijklmnopqrstuvwxyABC
<i>B. licheniformis</i> 114	5,67	abcdefghijklm	<i>B. lentus</i> 7	4,71	abcdefghijklmnopqrstuvwxyABC
<i>B. sphaericus</i> 110	5,65	abcdefghijklm	<i>B. subtilis</i> 94	4,70	abcdefghijklmnopqrstuvwxyABCD
<i>B. subtilis</i> 90	5,57	abcdefghijklm	<i>B. sphaericus</i> 57	4,68	abcdefghijklmnopqrstuvwxyABCD
<i>B. cereus</i> 5	5,55	abcdefghijklmn	<i>B. circulans</i> 73	4,68	abcdefghijklmnopqrstuvwxyABCD
<i>B. sphaericus</i> 108	5,54	abcdefghijklmn	<i>B. circulans</i> 33	4,67	abcdefghijklmnopqrstuvwxyABCDE
<i>B. cereus</i> 103	5,54	abcdefghijklmn	<i>B. lentus</i> 11	4,66	abcdefghijklmnopqrstuvwxyABCDE
<i>B. Circulans</i> 48	5,53	abcdefghijklmn	<i>B. lentus</i> 83	4,65	abcdefghijklmnopqrstuvwxyABCDE
<i>B. cereus</i> 32	5,52	abcdefghijklmn	<i>B. circulans</i> 127	4,63	efghijklmnopqrstuvwxyABCDEFG



Continuación....

Tratamientos	P (ppm)	Significancia	Tratamientos	P (ppm)	Significancia
<i>B. circulans</i> 15	4,62	fghijklmnopqrstuvwxyzABCDEFGH	<i>B. firmus</i> 147	3,07	qrstuvwxyzABCDEFGHIJKLM
<i>B. firmus</i> 9	4,59	ghijklmnopqrstuvwxyzABCDEFGHI	<i>B. cereus</i> 112	3,02	rstuvwxyzABCDEFGHIJKLM
<i>B. sphaericus</i> 122	4,59	ghijklmnopqrstuvwxyzABCDEFGHI	<i>B. firmus</i> 123	2,97	stuvwxyzABCDEFGHIJKLM
<i>B. firmus</i> 8	4,58	ghijklmnopqrstuvwxyzABCDEFGHIJ	<i>B. circulans</i> 161	2,94	tuvwxyzABCDEFGHIJKLM
<i>B. circulans</i> 21	4,56	hijklmnopqrstuvwxyzABCDEFGHIJK	<i>B. circulans</i> 164	2,92	tuvwxyzABCDEFGHIJKLM
<i>B. circulans</i> 22	4,55	hijklmnopqrstuvwxyzABCDEFGHIJKL	<i>B. firmus</i> 104	2,81	uvwxyzABCDEFGHIJKLM
<i>B. firmus</i> 131	4,52	ijklmnopqrstuvwxyzABCDEFGHIJKLM	<i>B. circulans</i> 138	2,78	uvwxyzABCDEFGHIJKLM
<i>B. cereus</i> 118	4,52	ijklmnopqrstuvwxyzABCDEFGHIJKLM	<i>B. brevis</i> 102	2,76	uvwxyzABCDEFGHIJKLM
<i>B. circulans</i> 69	4,51	ijklmnopqrstuvwxyzABCDEFGHIJKLM	<i>B. lentus</i> 75	2,76	vwxxyzABCDEFGHIJKLM
<i>B. cereus</i> 62	4,47	jklmnopqrstuvwxyzABCDEFGHIJKLM	<i>B. circulans</i> 132	2,73	vwxxyzABCDEFGHIJKLM
<i>B. lentus</i> 85	4,37	klmnopqrstuvwxyzABCDEFGHIJKLM	<i>B. circulans</i> 17	2,67	wxyzABCDEFGHIJKLM
<i>B. sphaericus</i> 65	4,36	klmnopqrstuvwxyzABCDEFGHIJKLM	<i>B. firmus</i> 67	2,60	xyzABCDEFGHIJKLM
<i>B. cereus</i> 26	4,36	klmnopqrstuvwxyzABCDEFGHIJKLM	<i>B. circulans</i> 124	2,52	yzABCDEFGHIJKLM
<i>B. firmus</i> 49	4,29	klmnopqrstuvwxyzABCDEFGHIJKLM	<i>B. firmus</i> 159	2,52	yzABCDEFGHIJKLM
<i>B. sphaericus</i> 46	4,11	lmnopqrstuvwxyzABCDEFGHIJKLM	<i>B. lentus</i> 137	2,54	yzABCDEFGHIJKLM
<i>B. lentus</i> 30	4,11	lmnopqrstuvwxyzABCDEFGHIJKLM	<i>B. circulans</i> 145	2,49	yzABCDEFGHIJKLM
<i>B. cereus</i> 79	4,08	mnopqrstuvwxyzABCDEFGHIJKLM	<i>B. lentus</i> 40	2,47	yzABCDEFGHIJKLM
<i>B. circulans</i> 149	4,06	nopqrstuvwxyzABCDEFGHIJKLM	<i>B. lentus</i> 160	2,47	yzABCDEFGHIJKLM
<i>B. cereus</i> 61	4,04	nopqrstuvwxyzABCDEFGHIJKLM	<i>B. circulans</i> 71	2,45	zABCDEFGHIJKLM
<i>B. circulans</i> 121	3,95	nopqrstuvwxyzABCDEFGHIJKLM	<i>B. licheniformis</i> 142	2,38	ABCDEFGHIJKLM
<i>B. cereus</i> 64	3,94	nopqrstuvwxyzABCDEFGHIJKLM	<i>B. sphaericus</i> 163	2,35	ABCDEFGHIJKLM
<i>B. circulans</i> 162	3,93	nopqrstuvwxyzABCDEFGHIJKLM	<i>B. lentus</i> 148	2,32	BCDEFGHIJKLM
<i>B. lentus</i> 68	3,84	nopqrstuvwxyzABCDEFGHIJKLM	<i>B. sphaericus</i> 58	2,31	BCDEFGHIJKLM
<i>B. circulans</i> 54	3,84	nopqrstuvwxyzABCDEFGHIJKLM	<i>B. brevis</i> 116	2,30	BCDEFGHIJKLM
<i>B. lentus</i> 74	3,83	nopqrstuvwxyzABCDEFGHIJKLM	<i>B. firmus</i> 140	2,23	BCDEFGHIJKLM
<i>B. subtilis</i> 146	3,83	nopqrstuvwxyzABCDEFGHIJKLM	<i>B. circulans</i> 66	2,10	CDEFGHIJKLM
<i>B. firmus</i> 42	3,79	nopqrstuvwxyzABCDEFGHIJKLM	<i>B. subtilis</i> 101	2,05	CDEFGHIJKLM
<i>B. lentus</i> 59	3,70	nopqrstuvwxyzABCDEFGHIJKLM	<i>B. cereus</i> 111	2,05	CDEFGHIJKLM
<i>B. circulans</i> 95	3,62	nopqrstuvwxyzABCDEFGHIJKLM	<i>B. lentus</i> 38	1,97	DEFGHIJKLM
<i>B. subtilis</i> 109	3,62	nopqrstuvwxyzABCDEFGHIJKLM	<i>B. circulans</i> 158	1,95	DEFGHIJKLM
<i>B. circulans</i> 1	3,51	nopqrstuvwxyzABCDEFGHIJKLM	<i>B. lentus</i> 78	1,95	DEFGHIJKLM
<i>B. lentus</i> 77	3,48	nopqrstuvwxyzABCDEFGHIJKLM	<i>B. circulans</i> 130	1,89	EFGHIJKLM
<i>B. circulans</i> 156	3,30	opqrstuvwxyzABCDEFGHIJKLM	<i>B. cereus</i> 93	1,84	FGHIJKLM
<i>B. cereus</i> 153	3,30	opqrstuvwxyzABCDEFGHIJKLM	<i>B. licheniformis</i> 155	1,78	GHIJKLM
<i>B. firmus</i> 34	3,28	opqrstuvwxyzABCDEFGHIJKLM	<i>B. circulans</i> 72	1,66	IJKLM
<i>B. circulans</i> 47	3,20	opqrstuvwxyzABCDEFGHIJKLM	<i>B. subtilis</i> 86	1,35	IJKLM
<i>B. firmus</i> 134	3,19	opqrstuvwxyzABCDEFGHIJKLM	<i>B. brevis</i> 106	1,32	JKLM
<i>B. firmus</i> 157	3,16	opqrstuvwxyzABCDEFGHIJKLM	<i>B. lentus</i> 133	1,24	KLM
<i>B. Circulans</i> 84	3,14	opqrstuvwxyzABCDEFGHIJKLM	<i>B. sphaericus</i> 125	1,25	KLM
<i>B. lentus</i> 82	3,13	opqrstuvwxyzABCDEFGHIJKLM	<i>B. circulans</i> 139	1,22	LM
<i>B. sphaericus</i> 154	3,10	pqrstuvwxyzABCDEFGHIJKLM	<i>B. firmus</i> 151	0,92	M

**Tabla 19.** Fósforo soluble (ppm) en medio líquido cultivado con *Bacillus* spp. seleccionado por alcanzar los mayores índices de solubilización

<i>Bacillus</i> spp.	Medio sólido	Medio líquido
	I S	P(ppm)
<i>B. circulans</i> 95	3,00	3,62
<i>B. subtilis</i> 94	3,00	4,70
<i>B. lentus</i> 59	3,00	3,70
<i>B. sphaericus</i> 108	2,90	5,55
<i>B. firmus</i> 104	2,90	2,81
<i>B. firmus</i> 141	2,90	5,28
<i>B. subtilis</i> 90	2,90	5,57
<i>B. cereus</i> 93	2,75	1,84
<i>B. brevis</i> 116	2,73	2,30
<i>B. firmus</i> 55	2,67	6,60
<i>B. brevis</i> 106	2,65	1,32
<i>B. brevis</i> 113	2,65	5,35
<i>B. subtilis</i> 109	2,53	3,62
<i>B. circulans</i> 81	2,46	6,50
<i>B. firmus</i> 143	2,45	5,41
<i>B. cereus</i> 45	2,42	7,01
<i>B. sphaericus</i> 57	2,38	4,69
<i>B. cereus</i> 96	2,38	5,96
<i>B. cereus</i> 153	2,38	3,30
<i>B. circulans</i> 87	2,37	5,43

**Tabla 20.** Índice de solubilización de *Bacillus* spp. seleccionado por alcanzar las mayores concentraciones (ppm) de fósforo soluble

<i>Bacillus</i> spp.	Medio líquido	Medio sólido
	P(ppm)	I S
<i>B.firmus</i> 98	8,60	2,10
<i>B.firmus</i> 55	8,50	2,67
<i>B.firmus</i> 105	7,69	2,13
<i>B.sphaericus</i> 6	7,68	2,00
<i>B.subtilis</i> 99	7,41	2,28
<i>B.circulans</i> 91	7,10	2,13
<i>B.cereus</i> 45	7,01	2,42
<i>B.cereus</i> 31	7,01	1,60
<i>B.cereus</i> 117	6,60	1,80
<i>B.circulans</i> 81	6,50	2,46
<i>B.subtilis</i> 97	6,49	2,00
<i>B. circulans</i> 37	6,40	1,50
<i>B.lentus</i> 12	6,34	2,00
<i>B.cereus</i> 89	6,30	2,00
<i>B.circulans</i> 19	6,28	1,60
<i>B.circulans</i> 14	6,27	1,75
<i>B.lentus</i> 35	6,27	1,50
<i>B.licheniformes</i> 60	6,24	1,50
<i>B.firmus</i> 36	6,21	1,75
<i>B.firmus</i> 53	6,11	2,17

## V. DISCUSIÓN

Las muestras de rizósfera de maíz resultaron adecuadas para el aislamiento de bacterias solubilizadoras de fosfato, debido a que en esta zona, las plantas liberan carbohidratos producidos durante la fotosíntesis, que al ser exudados por las raíces al ambiente, constituyen una fuente de nutrientes para el crecimiento de los microorganismos (Moreno, 2012). La rizósfera es el volumen de suelo unido a las raíces de las plantas, que se extiende de 1-5 mm de la superficie radical, donde la población de bacterias es 10-100 veces mayor que en el suelo no rizosférico (Lugtenberg & Kamilova, 2009).

Para el aislamiento de *Bacillus* spp. se realizó tratamiento térmico de las muestras de suelo rizosférico, basado en la resistencia de las endosporas a elevadas temperaturas, coincidiendo con Badía *et al.* (2011) y Altuna & Pelaez (2013). De esta manera, se obtuvieron 218 aislados, entre los que 85,9% correspondió a bacilos Gram positivos formadores de endosporas no deformantes y 14,1% a cocos Gram positivos. Los bacilos Gram positivos son reconocidos por su capacidad de formar endosporas no deformantes en el género *Bacillus* y deformantes en *Clostridium* spp. (Dürre & Hollergschwandner, 2004); sin embargo, también se mencionan cocos Gram positivos esporulantes del género *Sporosarcina*.

El 74,7% de las bacterias termotolerantes solubilizadoras de fosfato se aisló en NBRIP y el 25,7% en SRSM, diferencia explicada por la solubilidad en agua del fosfato utilizado, que es de 0,003% en el superfosfato triple y 0,02% en el fosfato dicálcico (Boatella *et al.*, 2004). Los medios de cultivo líquidos y sólidos,

con fosfato insoluble en solución, facilitan la detección de microorganismos solubilizadores. En medios líquidos la positividad está dada por el aclaramiento del medio (Vázquez *et al.*, 2000) y en medios sólidos por la formación de una zona clara o halo alrededor de la colonia (Patiño & Sánchez., 2012; Tejera *et al.*, 2013). Uno de los mecanismos de solubilización de fosfato es la excreción de ácidos orgánicos al medio, entre los que se mencionan el cítrico, láctico, succínico y propiónico, siendo este último uno de los principales compuestos con los que *B. megaterium* solubiliza fosfatos (Chen *et al.*, 2006).

El agar National Botanical Research Institute (NBRIP-P), con fosfato tricálcico, también fue utilizado para detectar solubilizadores en bacterias de suelos calcáreos (Patiño & Sánchez, 2012), y en *Bacillus* spp. aislados de arroz (Badía *et al.*, 2011; Tejera *et al.*, 2013). El agar Sundara Rao Sincha Medium (SRSM) con fosfato dicálcico también fue utilizado por Altuna & Pelaez (2013), Aguilar & Coral (2013) y Perleche & Rentería (2013) para *Bacillus* spp. rizosféricos de maíz, piñón blanco y malezas, respectivamente.

En el aislamiento de los bacilos termotolerantes, en agar SRSM, el diámetro máximo de los halos de solubilización fue de 6 mm, superando 2 mm reportado con *Bacillus* sp. aislado de malezas (Perleche & Rentería, 2013) y 5 mm con *Bacillus* sp. de maíz (Altuna & Pelaez, 2013). En agar NBRIP el diámetro máximo de las bacterias fue de 8,0 mm, superando 3,6 mm registrado con *Bacillus* sp. aislado de arroz (Badía *et al.*, 2011)

Después de dos subcultivos, la actividad solubilizadora de fosfato se mantuvo en todos los bacilos termotolerantes; sin embargo, en algunas bacterias disminuyó o aumentó el diámetro del halo. Al respecto, Carreño (2009) reportó que después de dos subcultivos en agar SRSM no se observaron halos de solubilización con el 20,74% de la bacterias aisladas de maíz, tomate y pallar, sugiriendo que como consecuencia de la pérdida de plásmidos asociados a la utilización de los azúcares, no se formaron los ácidos requeridos para la disolución del fosfato insoluble y tampoco se visualizó el halo transparente alrededor de las colonias bacterianas.

El mayor porcentaje de bacilos solubilizadores de fosfato y mayor diámetro en el halo de solubilización, correspondieron al agar NBRIP con fosfato tricálcico. La superioridad es explicada por la solubilidad en agua de la fuente de fósforo utilizada. Cuanto más insoluble, mayor es la visibilidad del halo de solubilización (Boatella *et al.*, 2004).

Los bacilos fueron caracterizados fenotípicamente coincidiendo con Calvo & Zúñiga (2010), Sosa *et al.* (2011) y Aysha *et al.* (2012). Se obtuvieron ocho morfotipos de colonias, predominando los de borde irregular, consistencia seca y espora central. Según Calvo & Zúñiga (2010) una característica común en todas las colonias de *Bacillus* es su forma irregular y color crema, la apariencia de los bordes varía entre aserrada, lobulada, digitiforme y ondulada, con elevación plana o acuminada, superficie opaca y consistencia seca, aunque también se presentan colonias cremosas y ligosas. Estos investigadores concluyeron que la consistencia seca de las colonias de *Bacillus* spp. estaría relacionada con la adaptación a condiciones desfavorables.

Una prueba determinante en la identificación de los bacilos fue la hidrólisis de la caseína, en la que se investigó la actividad lecitinasa sobre la lecitina de la yema de huevo (Sosa *et al.*, 2011). Las especies con actividad lecitinasa son *B. anthracis*, *B. mycoides*, *B. cereus* y *B. thuringiensis*, los tres primeros patógenos humanos, por lo que es muy importante realizar esta prueba, con la perspectiva de producir biofertilizantes, sin correr el riesgo afectar negativamente a los seres vivos y ambiente en general (Calvo & Zúñiga, 2010; Sosa *et al.*, 2011).

*Bacillus* spp. fue identificado en el 100% de bacilos termotolerantes, esporulantes, solubilizadoras de fosfato. Este género bacteriano también fue reportado como solubilizador de fosfato por Ríos & Zúñiga (2012), Aguilar & Coral (2013), Altuna & Pelaez (2013), Perleche & Rentería (2013) y Tejera *et al.* (2013) en *Bacillus* spp. aislados de tomate, piñón, maíz, malezas y arroz, respectivamente.

Las especies de *Bacillus* identificadas fueron *B. circulans*, *B. lentus*, *B. firmus*, *B. cereus*, *B. sphaericus*, *B. subtilis*, *B. licheniformis* y *B. brevis*. El género *Bacillus* es uno de los microorganismos estudiados en la solubilización de fosfato, destacando *B. megaterium* y *B. subtilis*, debido a que excretan al medio ácidos orgánicos como principal mecanismo de solubilización (Tejera *et al.*, 2011). También se han caracterizado como solubilizadores de fosfato *B. amyloliquefaciens*, *B. atrophaeus*, *B. licheniformis* (Vázquez *et al.*, 2000), *B. pumilus*, *B. sphaericus*, *B. cereus* (Wahyudi *et al.*, 2011), *B. circulans*, *B. lentus* y *B. firmus* (Ríos & Zúñiga, 2012).

Los valores del índice y área de solubilización fueron variables en todas las especies de *Bacillus*. Estas características fueron investigadas porque permiten seleccionar bacterias para la obtención de biofertilizantes (García & Álvarez, 2012). La variabilidad fue evidente, inclusive en bacterias de la misma especie. En este contexto, Chen *et al.* (2006) observaron deficiencias en el IS de dos cepas de *B. megaterium*, determinando que solo una de ellas presentaba el mecanismo de producción de ácidos orgánicos para la solubilización de fosfato.

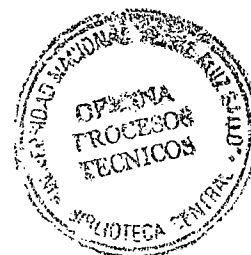
El índice de solubilización de fosfato máximo fue 3 superando 1,25 reportado por García & Álvarez (2012) para *Bacillus* sp. aislado de suelo calcáreo. En cuanto al área de solubilización máxima fue 50,24 mm<sup>2</sup>, inferior a 144,4 mm<sup>2</sup> registrado por García & Álvarez (2012). Estos investigadores explicaron que el área de solubilización permite diferenciar bacterias con similares IS, es decir una colonia bacteriana de menor diámetro puede presentar el mismo IS que una colonia con mayor diámetro, seleccionándose la de mayor área como promisorio para ser utilizada en la biofertilización.

En el medio NBRIP con roca fosfórica de Bayóvar no se observaron halos de solubilización, pero si colonias de *Bacillus* spp. Se coincide con Borda *et al.* (2009), Llenque & Melendez (2011) y Horna & Escobar (2013), quienes reportaron desarrollo de bacterias en agar SRSM y Pikovskaya con roca fosfórica de Bayóvar, observando viraje del indicador, pero no halo de solubilización. Al respecto, Quitral (2006) mencionó que las técnicas de agar

fosfato precipitado son útiles para aislar microorganismos solubilizadores, pero tienen sensibilidad limitada, porque la tasa de difusión de los ácidos orgánicos excretados, tasa de crecimiento de la colonia, así como la solubilidad de la fuente de fósforo, afectan el tamaño del halo. La constante de producto de solubilidad (Kps) determina la formación del halo, siendo la roca fosfórica más difícil de solubilizar. En este contexto, García & Álvarez (2012) aislaron bacterias solubilizadoras de fosfato, determinando que 9,25% solubilizó fosfato tricálcico y solo 0,55% solubilizó roca fosfórica.

El fosfato solubilizado por *Bacillus* spp. fue cuantificado mediante el método colorimétrico del molibdato, donde en solución ácida, los iones ortofosfato, producto de la solubilización del fosfato di o tricálcico, reaccionan con los iones molibdato, formando ácido molibdofosfórico. Este ácido, reducido en presencia de ácido ascórbico forma el azul de fosfomolibdeno, que presenta una coloración azul, susceptible de una determinación colorimétrica y su aparición es acelerada por el catalizador emético tartrato doble de antimonio y potasio (Rodier & Rodi, 2005).

Con *Bacillus* spp. aislados de suelo rizosférico de maíz se cuantificó hasta 8,60 ppm de fósforo soluble, superando 2,10-3,43 ppm alcanzados por *B. circulans* aislados de maíz (Altuna & Pelaez, 2013) y malezas (Perleche & Rentería, 2013); sin embargo, también se han reportado valores superiores de 11,58 ppm (Tejera *et al.*, 2013) y 16,77 ppm (Aguilar & Coral, 2013) en aislados de arroz y piñón, respectivamente.





## VI. CONCLUSIONES

- Las bacterias termotolerantes solubilizadoras de fosfato se aislaron de muestras de suelo rizosférico de maíz.
- El género *Bacillus* se identificó en las bacterias solubilizadoras de fosfato, correspondiendo 31% a *B. circulans*, 20% a *B. lentus*, 16% a *B. firmus*, 13% a *B. cereus*, 7% a *B. sphaericus*, 6% a *B. subtilis*, 4% a *B. licheniformis* y 3% a *B. brevis*.
- Los índices de solubilización de fosfato en medio sólido fueron de 1,08-3,0, con fosfato dicálcico y 1,09-3,0 con fosfato tricálcico.
- El fósforo soluble en medio líquido fue de 0,92-8,0 ppm.

## VII. RECOMENDACIONES

- Caracterizar a nivel molecular *Bacillus* spp.
- Determinar el efecto de *Bacillus* spp. solubilizadores de fosfato en el desarrollo vegetativo de maíz y otros cultivos agrícolas, en condiciones de invernadero.
- Determinar el efecto de *Bacillus* spp. solubilizadores de fosfato en el desarrollo vegetativo de maíz y otros cultivos agrícolas, en condiciones de campo.

## VIII. RESUMEN

El fósforo es un elemento esencial para las biomoléculas; sin embargo, en el suelo su disponibilidad es mínima, siendo limitante para los cultivos agrícolas. Con el objetivo de determinar las características de *Bacillus* spp. solubilizadores de fosfato, se colectaron 54 muestras de suelo rizosférico de *Zea mays* L. "maíz". Con las muestras se realizaron dos diluciones decimales con solución salina esterilizada y alícuotas se sembraron en agar Sundara, Rao & Sinha medium (SRSM) y agar National Botanical Research Institute (NBRI) con  $1 \text{ gL}^{-1}$  P, correspondiente a  $5,6 \text{ gL}^{-1}$  de fosfato dicálcico y  $5,0 \text{ gL}^{-1}$  de fosfato tricálcico, respectivamente, como fuentes de fósforo inorgánico insoluble. Las bacterias solubilizadoras de fósforo se reconocieron por las zonas transparentes formadas alrededor de las colonias, determinándose el IS con fosfato dicálcico, tricálcico y roca fosfórica de Bayóvar y el fósforo soluble en medio líquido NBRI. El género *Bacillus* se identificó en las bacterias solubilizadoras de fosfato, correspondiendo 31% a *B. circulans*, 20% a *B. lentus*, 16% *B. firmus*, 13% a *B. cereus*, 7% a *B. sphaericus*, 6% a *B. subtilis*, 4% a *B. licheniformis* y 3% a *B. brevis*. Los índices de solubilización de fosfato en medio sólido fueron 1,08-3,0, con fosfato dicálcico y 1,09-3,0 con fosfato tricálcico. El fósforo soluble en medio líquido fue de 0,92-8,0 ppm. Se demostró el potencial de *Bacillus* spp. nativas como biofertilizantes.

## IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguado, S. (Ed.). (2012). *Introducción al Uso y Manejo de los Biofertilizantes en la Agricultura*. México. Recuperado de [www.inifap.gob.mx](http://www.inifap.gob.mx)
- Aguilar, H. & Coral, J. (2013). *Caracterización de Bacillus spp. asociados a la rizosféra de Jatropha curcas L., "piñon blanco" en Lambayeque y su potencial como promotora del crecimiento de plantas*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Alexander, M. (1994). *Introducción a la Microbiología del Suelo*. México: Editorial AGT S. A.
- Altuna, H. & Pelaez, K. (2013). *Determinación del potencial como promotoras del crecimiento de plantas de las especies de Bacillus aisladas de rizósfera de Zea mays L. "maíz" en Lambayeque, 2013*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Alvitres, V. (2000). *Método Científico. Planificación de la Investigación*. 2da ed. Lambayeque: Editorial Ciencia.
- Alvarez, P. (2012). *Selección y evaluación de microorganismos solubilizadores de fosfatos en suelos calcáreos del valle del Mantaro*. (Tesis de Maestría). Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú.
- Aysha, O., Vinothkumar, P., Vasuki, S., Nirmala, P. & Reena, A. (2012). PGPR *Bacillus* isolated from tomato plant – a comparative study coconut water enrichment. *International for Bioassays*, 1(11), 131 – 137.
- Badía, M., Hernández, B., Murrel, J., Mahillon, J. & Perez, M. (2011). Aislamiento y caracterización de cepas de *Bacillus* asociadas al cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). *Revista Brasileira de Agroecología*, 6(1), 90-99.

- Becerra, J., Quintero, D., Martínez, M. & Matiz, A. (2011). Caracterización de microorganismos solubilizadores de fosfato aislados de suelos destinados al cultivo de uchuva (*Physalis peruviana* L.). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 5(2), 195-208.
- Beracochea, M. (2011). *Respuesta de variedades comerciales de maíz (Zea mays L.) e la inoculación con bacterias endófitas- diazotrofas nativas*. (Tesis de Licenciatura). Universidad de la Republica, Montevideo, Uruguay.
- Boatella, J., Codony, R. & López, P. (2004). *Química y Bioquímica de los alimentos II*. España: Publicacions I Edicions de la Universitat de Barcelona.
- Borda, D., Pardo, J. M., Martínez, M. M. & Montaña, J. S. (2009). Producción de un fertilizante a partir de un aislamiento de *Azotobacter nigricans* obtenido en un cultivo de *Stevia rebaudiana* Bert. *Revista Universitas Scientiarum*, 14.
- Brenner D., Krieg, N. & Staley, J. (2005). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria*, 2 (2). USA: Springer.
- Calvo, P. & Zuñiga, D. (2010). Caracterización fisiológica de cepas de *Bacillus* spp. aisladas de la rizósfera de papa (*Solanum tuberosum* L.). *Ecología aplicada*, 9(1), 31-39.
- Carreño, C. (2009). *Efecto de la inoculación de bacterias nativas solubilizadoras de fósforo en el desarrollo y rendimiento de tres cultivos agrícolas en Mochumi, Lambayeque, Perú*. (Tesis de Doctorado). Universidad Nacional de Trujillo, Perú.
- Chen, Y., Rekha, P., Arun, A., Shen, F., Lai, W. & Young, C. (2006). Phosphate solubilizing bacteria from tropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied Soil Ecology*, 34, 33 – 41.
- Coyne, M. (2000). *Microbiología del Suelo. Un enfoque exploratorio*. Madrid, España: Editorial Paraninfo.
- Cordero, J., Ortega, P. & Ortega, E. (2008). La inoculación de plantas con *Pantoea* sp., bacteria solubilizadora de fosfatos, incrementa la concentración de P en los tejidos foliares. *Revista Colombiana Biotecnología*, X (1), 11-120.

- Cuervo; J. (2010). *Aislamiento y caracterización de Bacillus spp. como fijadores biológicos de nitrógeno y solubilizadores de fosfatos en dos muestras de biofertilizantes comerciales*. (Tesis de Microbiólogo). Agrícola Veterinaria. Pontificia Universidad Javeriana, Colombia.
- Díaz, p., Ferrera, R., Almaraz, J. & Alcantar, G. (2001). Inoculación de bacterias promotoras de crecimiento en *Lactuca sativa* .*Terra*, 19, 327 – 335.
- Dürre, P, & Hollergschwandner, C. (2004). Initiation of endospore formation in *Clostridium acetobutylicum*. *Anaerobe*, 10(2), 69–74.
- Ferrera, R. (1995). Efecto de la rizósfera. En: Ferrera \_ Cerrato, R., Pérez, M. (eds). *Agromicrobiología Elemento útil en la Agricultura*. Montecillo, México: Colegio de postgraduados.
- Fernández , L., Zalba, P., Gómez, M. & Sagardoy, M. (2005). Bacterias solubilizadoras de fosfato inorgánico aisladas de suelos de la región sojera. *Ciencia Suelo*, 23(1).
- Filip, Z. (2002). Internacional approach to assessing soil quality by ecologically related biological parameters. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 88, 169 – 174.
- Franco, M. (2008). *Evaluación de caracteres PGPR en actinomicetos e interacciones de estas rizobacterias con hongos formadores de micorrizas*. (Tesis de Doctorado). Universidad de Granada, España.
- Garcia, S. & Alvarez, P. (2012). Selección y evaluación de microorganismos solubilizadores de fosfatos en suelo calcáreos del valle de Mantaro. Lima, Perú: Universidad Agraria la Molina.
- Hernández, M. & Chailloux, M. (2001). La Nutrición mineral y la Biofertilización. *Temas de Ciencia y Tecnología*, 5 (13), 11 – 27.
- Hernández, R., Fernández, C. & Bautista, P. (2003). *Metodología de la Investigación*. México: Mc Graw Hill Interamericana Editores S. A.
- Escobar, C. & Horna, Y. (2013). *Caracterización de cepas nativas de Azotobacter spp. y su potencial como promotoras del desarrollo vegetativo de “tomate” (Lycopersicon esculentum Mill.)*.(Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú

- Lara, C., Esquivel, L. & Negrete, J. (2011). Bacterias nativas solubilizadoras de fosfatos para incrementar los cultivos en el departamento de Córdoba-Colombia. *Revista Biotecnología Agropecuaria y Agroindustrial*, 9(2), 114-120.
- Llenque, D. & Melendez, P. (2011). *Efecto de bacterias nativas solubilizadoras de roca fosfórica de Bayóvar en el desarrollo de Zea mays L. "maíz" en invernadero*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Lutemberg, B. & Kamilova, F. (2009), Plant – Growth – Promoting rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*, 63, 541 – 556.
- Moratto, C., Martínez, L., Valencia, H., Sanchez J. (2006) Efecto del uso del suelo sobre hongos solubilizadores de fosfato y bacterias diazotróficas en el páramo de Guerrero (Cundinamarca). *Agronomía Colombiana*, 23 (2), 299 – 309.
- Moreno, B. (2012). La rizósfera y las relaciones entre las plantas y los microorganismos. En S. Aguado (Ed.). *Introducción al Uso y Manejo de los Biofertilizantes en la Agricultura* (pp.23-30). Recuperado de [www.INIFAP.gob.mx](http://www.INIFAP.gob.mx).
- Municipalidad Distrital de Reque. (2013). Recuperado de: (<http://www.google.com.pe/maps/>).
- Otero, V. (2011). *Aislamiento, selección e identificación de actinomicetos, bacterias fotosintéticas no sulfurosas y bacterias ácido lácticas con potencial biofertilizante a partir de suelos asociados al cultivo de plátano en la Costa Atlántica Colombiana*. (Tesis de Maestría). Universidad Nacional de Colombia.
- Patiño, C. & Sanchez, M. (2012). Aislamiento e identificación de bacterias solubilizadoras de fosfato habitantes de la rizosféra de Chontadura (*Bactris Gaspesiaes Kunth.*). *Biotecnología en el Sector Agropecuario Y Agroindustrial*, 10(2), 177 – 187.

- Peña, H., & Reyes, I. (2007). Aislamiento y evaluación de bacterias fijadoras de nitrógeno y disolvente de fosfatos en la promoción del crecimiento de la lechuga (*Lactuca sativa* L.). *Revista Venezolana Interciencia*, 32(8), 23-32.
- Perleche, C. & Rentería, M. (2013). *Determinación del potencial como promotores del crecimiento de plantas de las especies de Bacillus aisladas de la rizósfera de malezas asociadas a Zea mays L. "maíz" en Lambayeque*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Quiral, A. (2006). *Solubilización de roca fosfórica por hongos rizosféricos aislados de especies forrajeras de importancia de la X Región de Chile*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Austral de Chile, Chile.
- Rashid, M., Khalil, S., Ayub, N., Alam, S. & Latif, F. (2004). Organic acids production and phosphate solubilization by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) under *in vitro* conditions. *Pakistan Journal Biological Sciences*, 7 (2), 187 – 196.
- Reyes, I. (2003). *Biodiversidad de la disolución microbiana de los fosfatos minerales*. *Venezuela*, 11(1), 46 – 54.
- Rico, M. (2009). *Capacidad promotora de crecimiento vegetal por bacterias del género Azotobacter y actinomicetos aislados de cultivos de Solanum tuberosum Linnaeus, 1753 (papa) cultivados en zonas altoandinas del Peru*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Peru.
- Ríos, P. & Zúñiga, L. (2012). *Bacillus spp. aisladas de rizósfera de Lycopersicon esculentum Mill. "tomate" en Lambayeque y su potencial como promotoras del crecimiento de plantas*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Rodier, J. & Rodi, L. (2005). *Análisis de aguas*. España: Ediciones Omega.
- Rodriguez C. (2002). First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization. Julio 16 – 19; Sevilla, España.
- Salisbury, F. & Ross, C. (2000). *Fisiología de las Plantas 1. Células: agua, soluciones y superficies*. España: Editorial, Paraninfo.



- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, SAGARPA. (2010). Uso de fertilizantes. México. Recuperado de <http://www.sagarpa.gob.mx/>.
- Sosa, A., Álvarez, V., Torres, D., & Casadesús, L. (2011). Identificación y caracterización de seis aislados pertenecientes al género *Bacillus* promisorios para el control de *Rhizoctonia solani* Kühn y *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Fitosanidad*, 15(1), 39-43.
- Tejera, B., Heydrich, M. & Rojas, M. (2013). Aislamiento de *Bacillus* solubilizadores de fosfatos asociados al cultivo de arroz. *Agronomía Mesoamericana*, 24(2), 357-364.
- Tisdale, S., Nelson, W., Beaton, J. & Haylin, J. (1993). *Soil fertilitate and fertilizers*. 5 5d. New York, USA: Ediciones MacMilan.
- Urbano, P. (2001) *Tratado de Fitotecnica General*. 2 ed. España: Editorial Mundi – Prensa.
- Vazquez, P., Holguin, G., Puente, M., Lopez, A. & Bashan, Y.(2000).Phosphate solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. *Biology and Fertility of Soils*, 30(1), 400-408.
- Wahyudi, A., Puji, R., Widyawati, A., Meryandini, A., & Asih, A.(2011). Characterization of *Bacillus* sp. strains isolated from rhizosphere of soybean plants for their use as potential plant growth for promoting Rhizobacteria. *Journal of Microbiology and Antimicrobials*, 3(2), 34-40.
- Whitelaw, W. (2000). Growth promotion of plants Inoculated with phosphate solubilizing fungi. *Advances in Agronomy*, 69, 99 – 152.

# **ANEXOS**

## ANEXO 1

**Cálculo del número de muestras de suelo rizosférico de *Zea mays* L.  
(en Alvitres,2000)**

$$n = \frac{Z^2 p \cdot q}{T^2}$$

$$n = \frac{(1,96)^2 (0,90 \cdot 0,10)}{(0,8)^2}$$

$$n = 54,02 \text{ muestras}$$

Dónde:

n = Tamaño de la muestra

Z= 1,96 ( $\alpha$ = 0.05) valor estándar

p = prevalencia (0,90). Presencia de bacterias solubilizadoras de fosfato en rizósfera de maíz.

q = 1-p, ausencia (0,10).

T= error estimado (0,08).

## ANEXO 2

### Medios de cultivo para el aislamiento, identificación y mantenimiento de bacterias solubilizadoras de fosfato

#### a. Agar tripticasa soya, TSA (en Ríos & Zúñiga, 2012)

Componentes	gL <sup>-1</sup>
Triptona	15,0
Peptona	5,0
Extracto de levadura	3,0
Glucosa	5,0
Cloruro de sodio	5,0
Agar agar	15,0
Agua destilada	1000mL

#### b. Agar Sundara Rao Sinha Medium, SRSM (en Vazquez *et al.*, 2000)

Componentes	gL <sup>-1</sup>
Glucosa	10,0
Fosfato dicalcico	5,6
Sulfato de aminio	0,5
Cloruro de potasio	0,2
Sulfato de magnesio	0,3
Sulfato de manganeso	0,004
Sulfato de fierro	0,002
Cloruro de sodio	5,0
Extracto de levadura	0,5
Purpura de bromocresol	0,1
Agar agar	15
Agua destilada en cantidad suficiente	1000mL
pH	7,2

Como fuente de fósforo (1gL<sup>-1</sup>) se utilizó fosfato dicálcico.

**c. Medio de cultivo National Botanical Research Institute NBRIP ; (en Beracochea, 2011)**

Componentes	gL <sup>-1</sup>
Glucosa	10,0
Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	5,0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,1
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,25
KCl	0,2
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	5,0
Agar agar	15,0
Agua destilada en cantidad suficiente	1000 mL
pH	7,0

Para determinar el índice de solubilización, como fuente de fósforo se agregaron 5,6gL<sup>-1</sup> de fosfato dicálcico; 5, 0gL<sup>-1</sup> de fosfato tricálcico y 15,3gL<sup>-1</sup> de roca fosfórica de Bayovar. En todos los casos, se suplementó el medio con 45mg de fluconazol. (Disolver una cápsula de 150mg en 10mL de alcohol al 95% y agregar 2mL de antibiótico disuelto por litro de medio de cultivo.)

### ANEXO 3

#### Cálculo de fosfato dicálcico y fosfato tricálcico y Roca fosfórica de Bayóvar

##### 3.1. Fosfato dicálcico $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

PM = 172

$$\begin{array}{rcl} 172 & \longrightarrow & 31 \text{ de P} \\ x & \longrightarrow & 1 \text{ de P} \end{array}$$

$$x = 5,55 \text{ g}$$

Agregar 5,6 g de  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  para tener 1 g de fósforo por litro de medio de cultivo.

##### 3.2. Fosfato tricálcico $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$

PM = 310

$$\begin{array}{rcl} 310 & \longrightarrow & 62 \text{ de P} \\ x & \longrightarrow & 1 \text{ de P} \end{array}$$

$$x = 5,0 \text{ g}$$

Agregar 5,0 g de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  para tener 1 g de fósforo por litro de medio de cultivo.

##### 3.3. Roca fosfórica de Bayóvar

a.

$$\begin{array}{rcl} 142 \text{ g P}_2\text{O}_5 & \longrightarrow & 62 \text{ g de P} \\ x & \longrightarrow & 1 \text{ g de P} \end{array}$$

$$x = 2,290322 \text{ g P}_2\text{O}_5$$

##### b. Roca fosfórica tiene 30% de $\text{P}_2\text{O}_5$

$$\begin{array}{rcl} 2,290322 \text{ g P}_2\text{O}_5 & \longrightarrow & 30 \text{ g} \\ x & \longrightarrow & 100 \text{ g} \end{array}$$

$$x = 7,634408 \text{ g de roca fosfórica}$$

Agregar 7,634408 g de roca fosfórica a 1 L de medio para tener  $1 \text{ gL}^{-1}$  de fósforo.

## ANEXO 4

### Metodo colorimétrico del molibdato para cuantificar fosforo soluble (Rodier & Rodi, 2005)

#### a. Fundamento

En medio ácido y en presencia de molibdato amónico, los ortofosfato forman un complejo fosfomolibdico que reducido por el ácido ascórbico, desarrolla una coloración azul susceptible de una determinación colorimétrica y cuya aparición se acelera utilizando el catalizador emético, tartrato doble de antimonio y potasio.

#### b. Limpieza de los recipientes de vidrio

Para la limpieza del material de vidrio no utilizar detergentes que contengan fosfato. Lavarlos con ácido clorhídrico diluido y enjuagarlos cuidadosamente con agua destilada.

#### c. Reactivos

- **Solucion de ácido sulfúrico 5N**

Ácido sulfúrico	14mL
Agua destilada hasta enrase	100mL

- **Solución de molibdato amónico 4%** 20 ml

- **Solución de ácido ascórbico**

Ácido ascórbico	1,76 g
Agua destilada hasta enrase	100 ml

- **Solución de emético**

Tartrato doble de antimonio y potasio	0,0274 g
Agua destilada hasta enrase	100 ml

- **Reactivo para determinación de ortofosfato**

Ácido sulfúrico 5N	40 mL
Solución de molibdato amónico	12 mL
Solución de ácido ascórbico	24 mL

Solución de emético

4 mL

- **Solución madre de 0,2 mgL<sup>-1</sup> de fósforo**

Fosfato monopotásico previamente

desechado en estufa a 100 °C

877 g

Agua destilada hasta enrase

100 mL

- **Solución hija de 2 mgL<sup>-1</sup> de fósforo**

Diluir 1ml de solución madre en 99 de agua destilada (1/100)

#### d. Preparación de la curva de calibración

Colocar en una serie de matraces aforados de 25 ml

Número de matraces	T	I	II	III
Solución de fósforo de 2 mgL <sup>-1</sup> (mL)	0	1	2	5
Agua bidestilada (mL)	20	19	18	15
Reactivo indicador (mL)	4	4	4	4
Agua destilada hasta enrase (mL)	25	25	25	25
Correspondencia de fósforo (mgL <sup>-1</sup> )	0	0,1	0,2	0,5

Esperar 20 minutos y efectuar las lecturas en el espectrofotómetro a la longitud de onda de 690 nm en cubetas de 10 cm. Construir la curva de calibración. Los datos de absorbancias corregida se analizan mediante regresión lineal con el programa Microsoft Excel 2007 para obtener la ecuación de la recta y el coeficiente R<sup>2</sup> que deberá ser mayor a 0,9 para demostrar una dispersión homogénea de los valores sobre la recta.

#### e. Procedimiento para cuantificar fosfato en la muestra

Introducir 20 mL de la muestra a analizar en un matraz aforado de 25 mL.

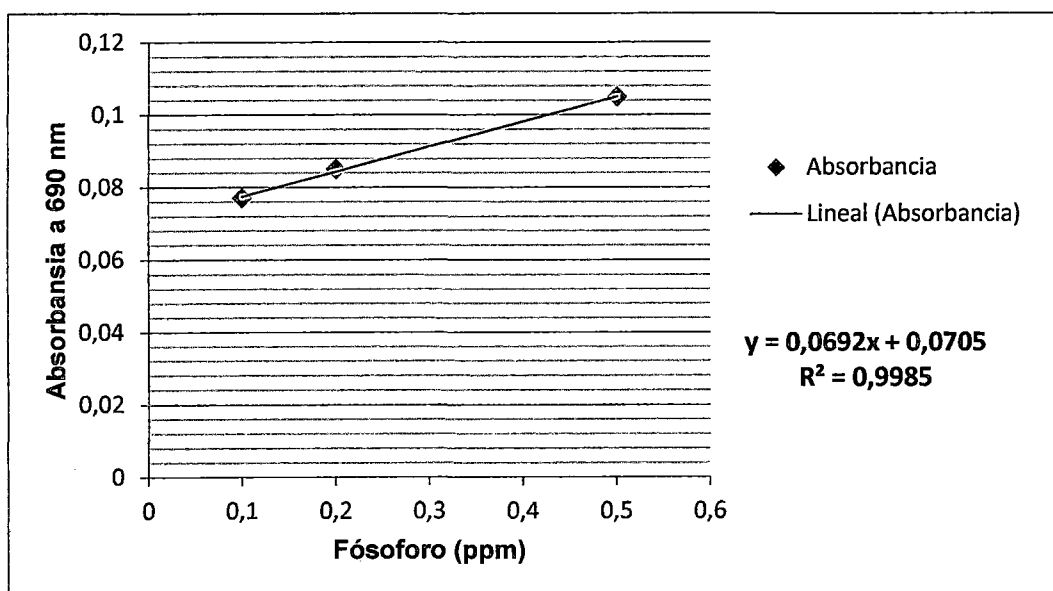
Añadir 4 mL de reactivo indicador, completar a 25 mL con agua destilada. Esperar 20 minutos y efectuar en el espectrofotómetro de luz visible con una longitud de onda de 690 nm. Tener en cuenta el valor leído para el testigo. Obtener los resultados en la curva de calibración. Para una muestra de 20 mL la curva indica el contenido de fósforo expresado en miligramos por litro.



Leer la absorbancia de cada dilución a 690 nm

N° de tubo	Fosforo soluble (ppm)	Absorbancia
1	0,1	0,077
2	0,2	0,085
3	0,5	0,105

Una vez obtenida la absorbancia de las tres concentraciones de fosfato dicálcico, introducir los datos en el programa Microsoft Office Excel 2007 y construir la curva patrón de calibración:



En la ecuación obtenida:

$$y = 0,0692x + 0,0705$$

Donde:

y: representa la absorbancia captada (variable dependiente)

x: cantidad de fósforo en ppm (variable independiente)

Despejar "x" para obtener la cantidad de fósforo (ppm) fijado por cada bacteria

<i>Bacillus spp.</i>	Halo (%)	Área (mm <sup>2</sup> )	<i>Bacillus spp.</i>	Halo (%)	Área (mm <sup>2</sup> )
----------------------	-------------	----------------------------	----------------------	-------------	----------------------------

nativa.

$$x = \frac{(y - 0,0705)}{0,0692}$$

## ANEXO 5

### Àrea de solubilizaci3n (mm<sup>2</sup>) de fosfato dicàlcico por *Bacillus* spp. natives

<i>B.subtilis</i> 109	5,0	19,63	<i>B.firmus</i> 9	3,0	7,07
<i>B.cereus</i> 141	5,0	19,63	<i>B.lentus</i> 13	3,0	7,07
<i>B.subtilis</i> 88	5,0	19,63	<i>B.firmus</i> 55	3,0	7,07
<i>B.sphaericus</i> 110	5,0	19,63	<i>B.licheniformes</i> 60	3,0	7,07
<i>B.firmus</i> 50	5,0	19,63	<i>B.cereus</i> 96	3,0	7,07
<i>B.circulans</i> 91	4,5	15,90	<i>B.brevis</i> 113	3,0	7,07
<i>B.cereus</i> 128	4,0	12,56	<i>B.firmus</i> 105	3,0	7,07
<i>B.cereus</i> 153	4,0	12,56	<i>B.circulans</i> 1	3,0	7,07
<i>B.firmus</i> 98	4,0	12,56	<i>B.circulans</i> 14	3,0	7,07
<i>B.lentus</i> 12	4,0	12,56	<i>B.lentus</i> 18	3,0	7,07
<i>B.circulans</i> 87	4,0	12,56	<i>B.cereus</i> 26	3,0	7,07
<i>B.subtilis</i> 94	4,0	12,56	<i>B.circulans</i> 51	3,0	7,07
<i>B.brevis</i> 116	4,0	12,56	<i>B.circulans</i> 56	3,0	7,07
<i>B.cereus</i> 136	4,0	12,56	<i>B.sphaericus</i> 57	3,0	7,07
<i>B.cereus</i> 144	4,0	12,56	<i>B.lentus</i> 59	3,0	7,07
<i>B.cereus</i> 152	4,0	12,56	<i>B.sphaericus</i> 115	3,0	7,07
<i>B.subtilis</i> 99	4,0	12,56	<i>B.cereus</i> 127	3,0	7,07
<i>B.circulans</i> 4	4,0	12,56	<i>B.cereus</i> 131	3,0	7,07
<i>B.cereus</i> 5	4,0	12,56	<i>B.firmus</i> 104	3,0	7,07
<i>B.sphaericus</i> 6	4,0	12,56	<i>B.licheniformes</i> 22	3,0	7,07
<i>B.firmus</i> 8	4,0	12,56	<i>B.circulans</i> 33	3,0	7,07
<i>B.lentus</i> 11	4,0	12,56	<i>B.firmus</i> 42	3,0	7,07
<i>B.lentus</i> 16	4,0	12,56	<i>B.circulans</i> 43	3,0	7,07
<i>B.lentus</i> 24	4,0	12,56	<i>B.circulans</i> 54	3,0	7,07
<i>B.cereus</i> 31	4,0	12,56	<i>B.circulans</i> 73	3,0	7,07
<i>B.subtilis</i> 97	4,0	12,56	<i>B.circulans</i> 76	3,0	7,07
<i>B.cereus</i> 111	4,0	12,56	<i>B.lentus</i> 77	3,0	7,07
<i>B.licheniformis</i> 114	4,0	12,56	<i>B.cereus</i> 134	3,0	7,07
<i>B.cereus</i> 117	4,0	12,56	<i>B.cereus</i> 135	3,0	7,07
<i>B.lentus</i> 52	4,0	12,56	<i>B.cereus</i> 146	3,0	7,07
<i>B.firmus</i> 53	4,0	12,56	<i>B.lentus</i> 44	3,0	7,07
<i>B.cereus</i> 120	4,0	12,56	<i>B.circulans</i> 100	3,0	7,07
<i>B.cereus</i> 129	4,0	12,56	<i>B.lentus</i> 40	3,0	7,07
<i>B.circulans</i> 47	4,0	12,56	<i>B.sphaericus</i> 58	3,0	7,07
<i>B.brevis</i> 106	4,0	12,56	<i>B.lentus</i> 38	3,0	7,07
<i>B.brevis</i> 102	4,0	12,56	<i>B.cereus</i> 130	3,0	7,07
<i>B.circulans</i> 81	3,0	7,07	<i>B.lentus</i> 70	2,0	3,14
<i>B.lentus</i> 25	3,0	7,07	<i>B.cereus</i> 118	2,0	3,14
<i>B.lentus</i> 41	3,0	7,07	<i>B.cereus</i> 45	2,0	3,14

Continuaci3n...

<b><i>Bacillus</i> spp.</b>	<b>Halo (%)</b>	<b>Área (mm<sup>2</sup>)</b>	<b><i>Bacillus</i> spp.</b>	<b>Halo (%)</b>	<b>Área (mm<sup>2</sup>)</b>
<i>B.firmus</i> 49	2,0	3,14	<i>B.circulans</i> 48	2,0	3,14
<i>B.circulans</i> 20	2,0	3,14	<i>B.cereus</i> 103	2,0	3,14
<i>B.circulans</i> 21	2,0	3,14	<i>B.sphaericus</i> 154	2,0	3,14
<i>B.circulans</i> 39	2,0	3,14	<i>B.firmus</i> 159	2,0	3,14
<i>B.cereus</i> 62	2,0	3,14	<i>B.lentus</i> 10	2,0	3,14
<i>B.subtilis</i> 86	2,0	3,14	<i>B.circulans</i> 15	2,0	3,14
<i>B.cereus</i> 119	2,0	3,14	<i>B.cereus</i> 28	2,0	3,14
<i>B.cereus</i> 126	2,0	3,14	<i>B.cereus</i> 32	2,0	3,14
<i>B.cereus</i> 137	2,0	3,14	<i>B.firmus</i> 36	2,0	3,14
<i>B.cereus</i> 143	2,0	3,14	<i>B.circulans</i> 66	2,0	3,14
<i>B.circulans</i> 2	2,0	3,14	<i>B.circulans</i> 71	2,0	3,14
<i>B.brevis</i> 3	2,0	3,14	<i>B.lentus</i> 82	2,0	3,14
<i>B.circulans</i> 17	2,0	3,14	<i>B.cereus</i> 125	2,0	3,14
<i>B.circulans</i> 19	2,0	3,14	<i>B.cereus</i> 132	2,0	3,14
<i>B.circulans</i> 23	2,0	3,14	<i>B.cereus</i> 133	2,0	3,14
<i>B.circulans</i> 27	2,0	3,14	<i>B.cereus</i> 138	2,0	3,14
<i>B.circulans</i> 29	2,0	3,14	<i>B.cereus</i> 139	2,0	3,14
<i>B.lentus</i> 30	2,0	3,14	<i>B.cereus</i> 140	2,0	3,14
<i>B.lentus</i> 35	2,0	3,14	<i>B.cereus</i> 145	2,0	3,14
<i>B.cereus</i> 61	2,0	3,14	<i>B.subtilis</i> 101	2,0	3,14
<i>B.circulans</i> 64	2,0	3,14	<i>B.firmus</i> 107	2,0	3,14
<i>B.sphaericus</i> 65	2,0	3,14	<i>B.firmus</i> 157	2,0	3,14
<i>B.lentus</i> 68	2,0	3,14	<i>B.circulans</i> 158	2,0	3,14
<i>B.circulans</i> 69	2,0	3,14	<i>B.lentus</i> 160	2,0	3,14
<i>B.lentus</i> 74	2,0	3,14	<i>B.circulans</i> 161	2,0	3,14
<i>B.lentus</i> 75	2,0	3,14	<i>B.circulans</i> 72	2,0	3,14
<i>B.cereus</i> 79	2,0	3,14	<i>B.licheniformes</i> 155	2,0	3,14
<i>B.lentus</i> 80	2,0	3,14	<i>B.sphaericus</i> 163	2,0	3,14
<i>B.lentus</i> 83	2,0	3,14	<i>B. circulans</i> 37	1,5	1,77
<i>B.circulans</i> 84	2,0	3,14	<i>B.lentus</i> 7	1,0	0,79
<i>B.lentus</i> 85	2,0	3,14	<i>B.circulans</i> 162	1,0	0,79
<i>B.cereus</i> 89	2,0	3,14	<i>B.circulans</i> 63	1,0	0,79
<i>B.cereus</i> 92	2,0	3,14	<i>B.cereus</i> 123	1,0	0,79
<i>B.cereus</i> 93	2,0	3,14	<i>B.cereus</i> 148	1,0	0,79
<i>B.cereus</i> 112	2,0	3,14	<i>B.cereus</i> 151	1,0	0,79
<i>B.cereus</i> 121	2,0	3,14	<i>B.circulans</i> 156	1,0	0,79
<i>B.cereus</i> 122	2,0	3,14	<i>B.circulans</i> 164	1,0	0,79
<i>B.cereus</i> 124	2,0	3,14	<i>B.firmus</i> 34	1,0	0,79
<i>B.cereus</i> 147	2,0	3,14	<i>B.firmus</i> 67	1,0	0,79
<i>B.cereus</i> 149	2,0	3,14	<i>B.lentus</i> 78	1,0	0,79
<i>B.sphaericus</i> 46	2,0	3,14	<i>B.cereus</i> 142	1,0	0,79

## ANEXO 6

### Área de solubilización (mm<sup>2</sup>) de fosfato tricálcico por *Bacillus* spp. nativas

<i>Bacillus</i> spp.	Halo (%)	Área (mm <sup>2</sup> )	<i>Bacillus</i> spp.	Halo (%)	Área (mm <sup>2</sup> )
<i>B.subtilis</i> 88	8,0	50,24	<i>B.subtilis</i> 97	5,0	19,63
<i>B.subtilis</i> 90	7,0	38,47	<i>B.licheniformis</i> 114	5,0	19,63
<i>B.circulans</i> 81	7,0	38,47	<i>B.cereus</i> 129	5,0	19,63
<i>B.cereus</i> 153	7,0	38,47	<i>B.lentus</i> 16	5,0	19,63
<i>B.cereus</i> 120	7,0	38,47	<i>B.cereus</i> 5	5,0	19,63
<i>B.cereus</i> 144	6,5	33,17	<i>B.firmus</i> 8	5,0	19,63
<i>B.subtilis</i> 94	6,0	28,26	<i>B.cereus</i> 31	5,0	19,63
<i>B.circulans</i> 95	6,0	28,26	<i>B.circulans</i> 1	5,0	19,63
<i>B.cereus</i> 141	6,0	28,26	<i>B.licheniformes</i> 60	5,0	19,63
<i>B.circulans</i> 87	6,0	28,26	<i>B.lentus</i> 59	4,0	12,56
<i>B.subtilis</i> 109	6,0	28,26	<i>B.firmus</i> 104	4,0	12,56
<i>B.brevis</i> 113	6,0	28,26	<i>B.sphaericus</i> 57	4,0	12,56
<i>B.brevis</i> 106	6,0	28,26	<i>B.sphaericus</i> 58	4,0	12,56
<i>B.cereus</i> 128	6,0	28,26	<i>B.cereus</i> 118	4,0	12,56
<i>B.firmus</i> 50	6,0	28,26	<i>B.cereus</i> 143	4,0	12,56
<i>B.firmus</i> 98	6,0	28,26	<i>B.cereus</i> 26	4,0	12,56
<i>B.lentus</i> 12	6,0	28,26	<i>B.circulans</i> 51	4,0	12,56
<i>B.lentus</i> 41	6,0	28,26	<i>B.lentus</i> 52	4,0	12,56
<i>B.cereus</i> 117	6,0	28,26	<i>B.firmus</i> 53	4,0	12,56
<i>B.cereus</i> 150	6,0	28,26	<i>B.circulans</i> 56	4,0	12,56
<i>B.cereus</i> 152	6,0	28,26	<i>B.subtilis</i> 86	4,0	12,56
<i>B.sphaericus</i> 110	6,0	28,26	<i>B.sphaericus</i> 115	4,0	12,56
<i>B.lentus</i> 25	6,0	28,26	<i>B.circulans</i> 14	4,0	12,56
<i>B.cereus</i> 136	6,0	28,26	<i>B.circulans</i> 21	4,0	12,56
<i>B.subtilis</i> 99	5,5	23,75	<i>B.circulans</i> 23	4,0	12,56
<i>B.firmus</i> 55	5,0	19,63	<i>B.lentus</i> 38	4,0	12,56
<i>B.sphaericus</i> 108	5,0	19,63	<i>B.firmus</i> 42	4,0	12,56
<i>B.brevis</i> 116	5,0	19,63	<i>B.circulans</i> 54	4,0	12,56
<i>B.firmus</i> 9	5,0	19,63	<i>B.cereus</i> 127	4,0	12,56
<i>B.lentus</i> 11	5,0	19,63	<i>B.cereus</i> 131	4,0	12,56
<i>B.circulans</i> 91	5,0	19,63	<i>B.lentus</i> 44	4,0	12,56
<i>B.cereus</i> 96	5,0	19,63	<i>B.lentus</i> 40	4,0	12,56
<i>B.cereus</i> 111	5,0	19,63	<i>B.lentus</i> 77	4,0	12,56
<i>B.cereus</i> 45	5,0	19,63	<i>B.lentus</i> 18	4,0	12,56
<i>B.circulans</i> 47	5,0	19,63	<i>B.circulans</i> 20	4,0	12,56
<i>B.circulans</i> 100	5,0	19,63	<i>B.circulans</i> 39	4,0	12,56
<i>B.firmus</i> 105	5,0	19,63	<i>B.cereus</i> 126	4,0	12,56
<i>B.circulans</i> 4	5,0	19,63	<i>B.firmus</i> 159	4,0	12,56
<i>B.sphaericus</i> 6	5,0	19,63	<i>B.cereus</i> 93	3,0	7,07
<i>B.lentus</i> 13	5,0	19,63	<i>B.cereus</i> 89	3,0	7,07
<i>B.lentus</i> 24	5,0	19,63	<i>B.cereus</i> 92	3,0	7,07

Continuación...

<b>Bacillus spp.</b>	<b>Halo (%)</b>	<b>Área (mm<sup>2</sup>)</b>	<b>Bacillus spp.</b>	<b>Halo (%)</b>	<b>Área (mm<sup>2</sup>)</b>
<i>B.sphaericus</i> 46	3,0	7,07	<i>B.lentus</i> 74	3,0	7,07
<i>B.brevis</i> 102	3,0	7,07	<i>B.cereus</i> 122	3,0	7,07
<i>B.lentus</i> 83	3,0	7,07	<i>B.cereus</i> 130	3,0	7,07
<i>B.cereus</i> 28	3,0	7,07	<i>B.cereus</i> 146	3,0	7,07
<i>B.cereus</i> 32	3,0	7,07	<i>B.sphaericus</i> 154	3,0	7,07
<i>B.circulans</i> 33	3,0	7,07	<i>B.circulans</i> 27	3,0	7,07
<i>B.firmus</i> 36	3,0	7,07	<i>B.circulans</i> 69	3,0	7,07
<i>B.cereus</i> 112	3,0	7,07	<i>B.circulans</i> 73	3,0	7,07
<i>B.cereus</i> 119	3,0	7,07	<i>B.lentus</i> 75	3,0	7,07
<i>B.cereus</i> 137	3,0	7,07	<i>B. circulans</i> 37	2,5	4,91
<i>B.cereus</i> 103	3,0	7,07	<i>B.subtilis</i> 101	2,0	3,14
<i>B.licheniformes</i> 22	3,0	7,07	<i>B.cereus</i> 140	2,0	3,14
<i>B.circulans</i> 43	3,0	7,07	<i>B.firmus</i> 107	2,0	3,14
<i>B.lentus</i> 85	3,0	7,07	<i>B.cereus</i> 123	2,0	3,14
<i>B.cereus</i> 134	3,0	7,07	<i>B.lentus</i> 10	2,0	3,14
<i>B.cereus</i> 135	3,0	7,07	<i>B.cereus</i> 139	2,0	3,14
<i>B.cereus</i> 147	3,0	7,07	<i>B.circulans</i> 64	2,0	3,14
<i>B.cereus</i> 149	3,0	7,07	<i>B.circulans</i> 72	2,0	3,14
<i>B.firmus</i> 49	3,0	7,07	<i>B.cereus</i> 133	2,0	3,14
<i>B.circulans</i> 2	3,0	7,07	<i>B.cereus</i> 145	2,0	3,14
<i>B.lentus</i> 7	3,0	7,07	<i>B.licheniformes</i> 155	2,0	3,14
<i>B.circulans</i> 19	3,0	7,07	<i>B.circulans</i> 15	2,0	3,14
<i>B.circulans</i> 29	3,0	7,07	<i>B.circulans</i> 158	2,0	3,14
<i>B.lentus</i> 35	3,0	7,07	<i>B.circulans</i> 161	2,0	3,14
<i>B.cereus</i> 62	3,0	7,07	<i>B.sphaericus</i> 163	2,0	3,14
<i>B.lentus</i> 70	3,0	7,07	<i>B.circulans</i> 164	2,0	3,14
<i>B.circulans</i> 76	3,0	7,07	<i>B.cereus</i> 125	2,0	3,14
<i>B.lentus</i> 80	3,0	7,07	<i>B.lentus</i> 160	2,0	3,14
<i>B.circulans</i> 84	3,0	7,07	<i>B.circulans</i> 63	2,0	3,14
<i>B.cereus</i> 124	3,0	7,07	<i>B.circulans</i> 66	2,0	3,14
<i>B.circulans</i> 48	3,0	7,07	<i>B.firmus</i> 157	2,0	3,14
<i>B.circulans</i> 162	3,0	7,07	<i>B.circulans</i> 71	2,0	3,14
<i>B.brevis</i> 3	3,0	7,07	<i>B.cereus</i> 132	2,0	3,14
<i>B.circulans</i> 17	3,0	7,07	<i>B.cereus</i> 138	2,0	3,14
<i>B.lentus</i> 30	3,0	7,07	<i>B.cereus</i> 148	2,0	3,14
<i>B.cereus</i> 79	3,0	7,07	<i>B.circulans</i> 156	2,0	3,14
<i>B.lentus</i> 82	3,0	7,07	<i>B.cereus</i> 151	2,0	3,14
<i>B.cereus</i> 121	3,0	7,07	<i>B.firmus</i> 34	1,5	1,77
<i>B.cereus</i> 61	3,0	7,07	<i>B.cereus</i> 142	1,0	0,79
<i>B.sphaericus</i> 65	3,0	7,07	<i>B.firmus</i> 67	1,0	0,79
<i>B.lentus</i> 68	3,0	7,07	<i>B.lentus</i> 78	1,0	0,79

## ANEXO 7

### Índice de solubilización (%) de *Bacillus* spp. nativas en agar NBRIP con fosfato dicálcico

<i>Bacillus</i> spp.	Halo más colonia (mm)	Colonia (mm)	I S (%)	<i>Bacillus</i> spp.	Halo más colonia (mm)	Colonia (mm)	I S (%)
<i>B.sphaericus</i> 6	6,0	2,0	3,00	<i>B.circulans</i> 54	7,0	4,0	1,75
<i>B.subtilis</i> 90	10,0	4,0	2,50	<i>B.cereus</i> 128	10,0	6,0	1,67
<i>B.lentus</i> 59	5,0	2,0	2,50	<i>B.firmus</i> 98	10,0	6,0	1,67
<i>B.firmus</i> 104	5,0	2,0	2,50	<i>B.cereus</i> 152	10,0	6,0	1,67
<i>B.subtilis</i> 94	7,0	3,0	2,30	<i>B.lentus</i> 24	10,0	6,0	1,67
<i>B.circulans</i> 95	9,0	4,0	2,25	<i>B.subtilis</i> 97	10,0	6,0	1,67
<i>B.cereus</i> 141	9,0	4,0	2,25	<i>B.lentus</i> 52	10,0	6,0	1,67
<i>B.circulans</i> 87	8,0	4,0	2,00	<i>B.cereus</i> 89	5,0	3,0	1,67
<i>B.subtilis</i> 109	10,0	5,0	2,00	<i>B.firmus</i> 159	5,0	3,0	1,67
<i>B.firmus</i> 9	6,0	3,0	2,00	<i>B.cereus</i> 140	5,0	3,0	1,67
<i>B.lentus</i> 11	8,0	4,0	2,00	<i>B.circulans</i> 72	5,0	3,0	1,67
<i>B.subtilis</i> 88	10,0	5,0	2,00	<i>B.lentus</i> 25	8,0	5,0	1,60
<i>B.circulans</i> 91	9,0	4,5	2,00	<i>B.circulans</i> 1	8,0	5,0	1,60
<i>B.cereus</i> 96	6,0	3,0	2,00	<i>B.cereus</i> 131	8,0	5,0	1,60
<i>B.cereus</i> 111	8,0	4,0	2,00	<i>B.firmus</i> 42	8,0	5,0	1,60
<i>B.cereus</i> 117	8,0	4,0	2,00	<i>B.lentus</i> 44	8,0	5,0	1,60
<i>B.firmus</i> 50	10,0	5,0	2,00	<i>B.firmus</i> 8	11,0	7,0	1,57
<i>B.brevis</i> 106	8,0	4,0	2,00	<i>B.cereus</i> 31	11,0	7,0	1,57
<i>B.cereus</i> 93	4,0	2,0	2,00	<i>B.licheniformis</i> 114	11,0	7,0	1,57
<i>B.sphaericus</i> 46	4,0	2,0	2,00	<i>B.cereus</i> 120	11,0	7,0	1,57
<i>B.circulans</i> 100	6,0	3,0	2,00	<i>B.lentus</i> 75	15,0	13,0	1,53
<i>B.sphaericus</i> 58	6,0	3,0	2,00	<i>B.circulans</i> 81	9,0	6,0	1,50
<i>B.sphaericus</i> 110	11,0	6,0	1,83	<i>B.cereus</i> 118	6,0	4,0	1,50
<i>B.cereus</i> 153	9,0	5,0	1,80	<i>B.cereus</i> 5	12,0	8,0	1,50
<i>B.lentus</i> 12	9,0	5,0	1,80	<i>B.cereus</i> 45	6,0	4,0	1,50
<i>B.brevis</i> 116	9,0	5,0	1,80	<i>B.brevis</i> 113	9,0	6,0	1,50
<i>B.cereus</i> 144	9,0	5,0	1,80	<i>B.circulans</i> 14	9,0	6,0	1,50
<i>B.subtilis</i> 99	9,0	5,0	1,80	<i>B.lentus</i> 18	9,0	6,0	1,50
<i>B.circulans</i> 4	9,0	5,0	1,80	<i>B.circulans</i> 51	9,0	6,0	1,50
<i>B.lentus</i> 16	9,0	5,0	1,80	<i>B.firmus</i> 53	12,0	8,0	1,50
<i>B.cereus</i> 129	9,0	5,0	1,80	<i>B.subtilis</i> 86	6,0	4,0	1,50
<i>B.circulans</i> 47	9,0	5,0	1,80	<i>B.cereus</i> 137	6,0	4,0	1,50
<i>B.brevis</i> 102	9,0	5,0	1,80	<i>B.cereus</i> 143	6,0	4,0	1,50
<i>B.sphaericus</i> 108	7,0	4,0	1,75	<i>B.circulans</i> 23	6,0	4,0	1,50
<i>B.cereus</i> 150	7,0	4,0	1,75	<i>B.circulans</i> 33	9,0	6,0	1,50
<i>B.firmus</i> 55	7,0	4,0	1,75	<i>B.circulans</i> 43	9,0	6,0	1,50
<i>B.firmus</i> 105	7,0	4,0	1,75	<i>B.lentus</i> 77	9,0	6,0	1,50
<i>B.cereus</i> 26	7,0	4,0	1,75	<i>B.lentus</i> 83	6,0	4,0	1,50
<i>B.circulans</i> 56	7,0	4,0	1,75	<i>B.cereus</i> 112	6,0	4,0	1,50
<i>B.sphaericus</i> 57	7,0	4,0	1,75	<i>B.cereus</i> 134	9,0	6,0	1,50
<i>B.sphaericus</i> 115	7,0	4,0	1,75	<i>B.cereus</i> 135	9,0	6,0	1,50

Continuación....

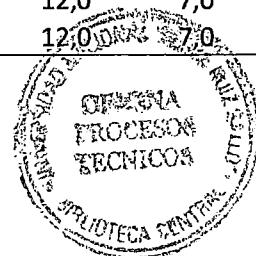
<i>Bacillus</i> spp.	Halo más colonia (mm)	Colonia (mm)	I S (%)	<i>Bacillus</i> spp.	Halo más colonia (mm)	Colonia (mm)	I S (%)
<i>B.lentus</i> 40	9,0	6,0	1,50	<i>B.circulans</i> 39	9,0	7,0	1,29
<i>B.subtilis</i> 101	6,0	4,0	1,50	<i>B.circulans</i> 2	9,00	7,0	1,29
<i>B.firmus</i> 107	6,0	4,0	1,50	<i>B.cereus</i> 124	9,0	7,0	1,29
<i>B.lentus</i> 38	9,0	6,0	1,50	<i>B.cereus</i> 133	9,0	7,0	1,29
<i>B.lentus</i> 41	10,0	7,0	1,43	<i>B.licheniformes</i> 155	9,0	7,0	1,29
<i>B.lentus</i> 13	10,0	7,0	1,43	<i>B.circulans</i> 17	10,0	8,0	1,25
<i>B.cereus</i> 127	10,0	7,0	1,43	<i>B.licheniformes</i> 22	9,0	6,0	1,25
<i>B.circulans</i> 76	10,0	7,0	1,43	<i>B.circulans</i> 27	10,0	8,0	1,25
<i>B.cereus</i> 148	8,0	7,0	1,43	<i>B.lentus</i> 30	10,0	8,0	1,25
<i>B.firmus</i> 49	7,0	5,0	1,40	<i>B.circulans</i> 84	10,0	8,0	1,25
<i>B.circulans</i> 20	7,0	5,0	1,40	<i>B.cereus</i> 121	10,0	8,0	1,25
<i>B.circulans</i> 21	7,0	5,0	1,40	<i>B.sphaericus</i> 154	10,0	8,0	1,25
<i>B.cereus</i> 62	7,0	5,0	1,40	<i>B.circulans</i> 15	10,0	8,0	1,25
<i>B.cereus</i> 119	7,0	5,0	1,40	<i>B.lentus</i> 82	10,00	8,0	1,25
<i>B.lentus</i> 35	7,0	5,0	1,40	<i>B.cereus</i> 123	5,0	4,0	1,25
<i>B.lentus</i> 80	7,0	5,0	1,40	<i>B.circulans</i> 158	10,0	8,0	1,25
<i>B.lentus</i> 85	7,0	5,0	1,40	<i>B.firmus</i> 34	5,0	4,0	1,25
<i>B.cereus</i> 147	7,0	5,0	1,40	<i>B.sphaericus</i> 163	10,0	8,0	1,25
<i>B.cereus</i> 149	7,0	5,0	1,40	<i>B.cereus</i> 126	11,0	9,0	1,22
<i>B.cereus</i> 28	7,0	5,0	1,40	<i>B.circulans</i> 66	11,0	9,0	1,22
<i>B.cereus</i> 32	7,0	5,0	1,40	<i>B.circulans</i> 71	12,0	10,0	1,22
<i>B.firmus</i> 36	7,0	5,0	1,40	<i>B.lentus</i> 160	11,0	9,0	1,22
<i>B.cereus</i> 146	11,0	8,0	1,38	<i>B.cereus</i> 61	12,0	10,0	1,20
<i>B.cereus</i> 136	15,0	11,0	1,37	<i>B.circulans</i> 64	12,0	10,0	1,20
<i>B.lentus</i> 70	8,0	6,0	1,33	<i>B.lentus</i> 68	12,0	10,0	1,20
<i>B.licheniformes</i> 60	12,0	9,0	1,33	<i>B.cereus</i> 79	12,0	10,0	1,20
<i>B.brevis</i> 3	8,0	6,0	1,33	<i>B.circulans</i> 162	6,0	5,0	1,20
<i>B.lentus</i> 7	4,0	3,0	1,33	<i>B.cereus</i> 125	12,0	10,0	1,20
<i>B.circulans</i> 19	8,0	6,0	1,33	<i>B.cereus</i> 139	12,0	10,0	1,20
<i>B.circulans</i> 29	8,0	6,0	1,33	<i>B.circulans</i> 161	12,0	10,0	1,20
<i>B.sphaericus</i> 65	8,0	6,0	1,33	<i>B.cereus</i> 132	13,0	11,0	1,18
<i>B.lentus</i> 74	8,0	6,0	1,33	<i>B.cereus</i> 145	13,0	11,0	1,18
<i>B.cereus</i> 92	8,0	6,0	1,33	<i>B.circulans</i> 69	15,0	13,0	1,15
<i>B.cereus</i> 122	8,0	6,0	1,33	<i>B.cereus</i> 138	15,0	13,0	1,15
<i>B.circulans</i> 48	8,0	6,0	1,33	<i>B.firmus</i> 157	15,0	13,0	1,15
<i>B.cereus</i> 103	8,0	6,0	1,33	<i>B.cereus</i> 151	9,0	8,0	1,13
<i>B. circulans</i> 37	6,0	4,5	1,33	<i>B.circulans</i> 156	11,0	10,0	1,10
<i>B.lentus</i> 10	8,0	6,0	1,33	<i>B.circulans</i> 164	10,0	9,0	1,10
<i>B.cereus</i> 130	12,0	9,0	1,33	<i>B.firmus</i> 67	12,0	11,0	1,09
<i>B.cereus</i> 142	4,0	3,0	1,33	<i>B.lentus</i> 78	13,0	12,0	1,08
<i>B.circulans</i> 73	13,0	10,0	1,30	<i>B.circulans</i> 63	13,0	12,0	1,08



## ANEXO 8

### Índice de solubilización (%) de *Bacillus* spp. nativas en agar NBRIP con fosfato tricálcico

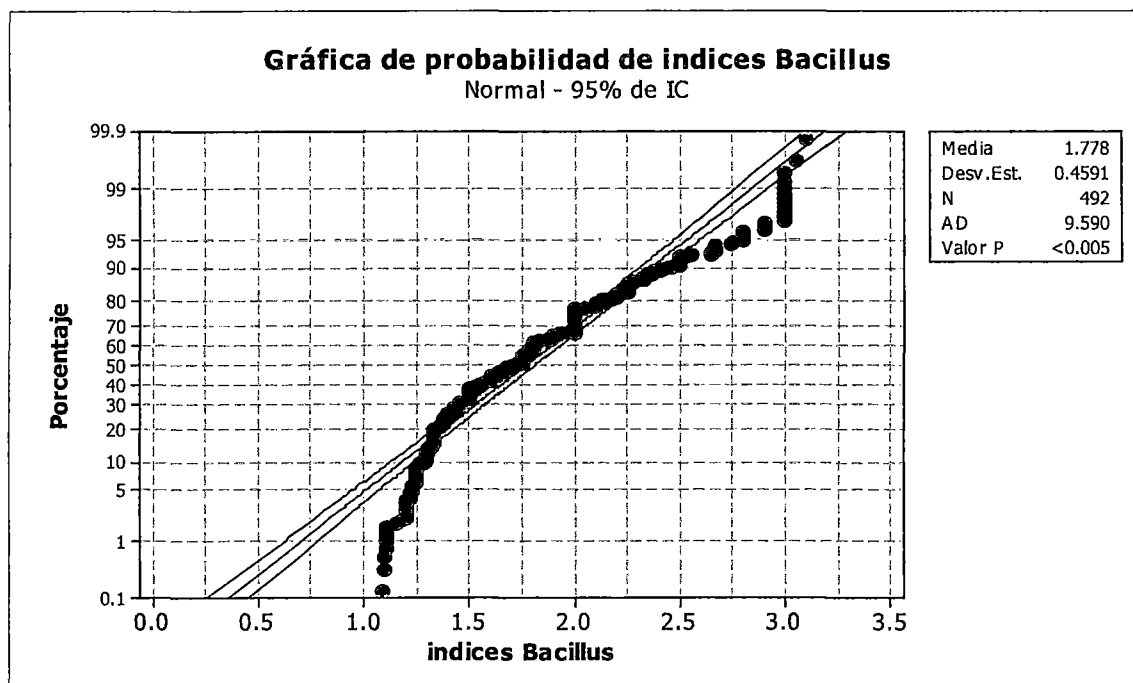
<i>Bacillus</i> spp.	Halo más colonia (mm)	Colonia (mm)	I S (%)	<i>Bacillus</i> spp.	Halo más colonia (mm)	Colonia (mm)	I S (%)
<i>B. circulans</i> 95	9,0	3,0	3,00	<i>B. lentus</i> 41	10,0	5,0	2,00
<i>B. subtilis</i> 94	9,0	3,0	3,00	<i>B. firmus</i> 144	10,0	5,0	2,00
<i>B. lentus</i> 59	9,0	3,0	3,00	<i>B. circulans</i> 51	10,0	5,0	2,00
<i>B. sphaericus</i> 108	11,0	4,0	2,90	<i>B. lentus</i> 12	10,0	5,0	2,00
<i>B. firmus</i> 104	11,0	4,0	2,90	<i>B. lentus</i> 24	10,0	5,0	2,00
<i>B. firmus</i> 141	11,0	4,0	2,90	<i>B. lentus</i> 52	10,0	5,0	2,00
<i>B. subtilis</i> 90	8,0	3,0	2,90	<i>B. cereus</i> 92	8,0	4,0	2,00
<i>B. cereus</i> 93	8,0	3,0	2,75	<i>B. cereus</i> 89	8,0	4,0	2,00
<i>B. brevis</i> 116	8,0	3,0	2,73	<i>B. subtilis</i> 97	8,0	4,0	2,00
<i>B. firmus</i> 55	10,0	4,0	2,67	<i>B. lentus</i> 150	8,0	4,0	2,00
<i>B. brevis</i> 106	10,0	4,0	2,65	<i>B. circulans</i> 4	8,0	4,0	2,00
<i>B. brevis</i> 113	10,0	4,0	2,65	<i>B. lentus</i> 16	8,0	4,0	2,00
<i>B. subtilis</i> 109	10,0	4,0	2,53	<i>B. lentus</i> 83	8,0	4,0	2,00
<i>B. circulans</i> 81	5,0	2,0	2,46	<i>B. sphaericus</i> 110	6,0	3,0	2,00
<i>B. firmus</i> 143	12,0	5,0	2,45	<i>B. licheniformis</i> 114	6,0	3,0	2,00
<i>B. cereus</i> 45	12,0	5,0	2,42	<i>B. sphaericus</i> 6	6,0	3,0	2,00
<i>B. sphaericus</i> 57	7,0	3,0	2,38	<i>B. cereus</i> 26	6,0	3,0	2,00
<i>B. cereus</i> 96	7,0	3,0	2,38	<i>B. sphaericus</i> 46	4,0	2,0	2,00
<i>B. cereus</i> 153	7,0	3,0	2,38	<i>B. circulans</i> 54	11,0	6,0	1,83
<i>B. circulans</i> 87	7,0	3,0	2,37	<i>B. cereus</i> 117	13,0	7,0	1,80
<i>B. cereus</i> 111	9,0	4,0	2,34	<i>B. licheniformis</i> 128	9,0	5,0	1,80
<i>B. subtilis</i> 99	9,0	4,0	2,28	<i>B. subtilis</i> 101	9,0	5,0	1,80
<i>B. sphaericus</i> 58	9,0	4,0	2,27	<i>B. sphaericus</i> 115	9,0	5,0	1,80
<i>B. circulans</i> 56	9,0	4,0	2,27	<i>B. cereus</i> 103	9,0	5,0	1,80
<i>B. circulans</i> 100	9,0	4,0	2,25	<i>B. firmus</i> 131	9,0	5,0	1,80
<i>B. firmus</i> 107	9,0	4,0	2,24	<i>B. cereus</i> 112	9,0	5,0	1,80
<i>B. cereus</i> 118	9,0	4,0	2,17	<i>B. circulans</i> 127	9,0	5,0	1,80
<i>B. firmus</i> 53	9,0	4,0	2,17	<i>B. circulans</i> 23	9,0	5,0	1,80
<i>B. subtilis</i> 86	9,0	4,0	2,17	<i>B. lentus</i> 44	9,0	5,0	1,80
<i>B. circulans</i> 91	10,0	4,5	2,13	<i>B. circulans</i> 21	7,0	4,0	1,80
<i>B. lentus</i> 13	11,0	5,0	2,13	<i>B. firmus</i> 42	16,0	9,0	1,78
<i>B. circulans</i> 47	11,0	5,0	2,13	<i>B. lentus</i> 38	7,0	4,0	1,75
<i>B. firmus</i> 9	11,0	5,0	2,13	<i>B. lentus</i> 137	7,0	4,0	1,75
<i>B. firmus</i> 105	12,0	5,5	2,13	<i>B. circulans</i> 14	7,0	4,0	1,75
<i>B. lentus</i> 11	16,0	8,0	2,13	<i>B. cereus</i> 5	7,0	4,0	1,75
<i>B. subtilis</i> 88	12,0	6,0	2,10	<i>B. firmus</i> 36	7,0	4,0	1,75
<i>B. subtilis</i> 129	12,0	6,0	2,10	<i>B. cereus</i> 120	7,0	4,0	1,75
<i>B. firmus</i> 98	12,0	6,0	2,10	<i>B. firmus</i> 136	7,0	4,0	1,75
<i>B. firmus</i> 50	12,0	6,0	2,10	<i>B. firmus</i> 140	7,0	4,0	1,75
<i>B. brevis</i> 102	12,0	6,0	2,10	<i>B. cereus</i> 119	12,0	7,0	1,71
<i>B. circulans</i> 152	10,0	5,0	2,10	<i>B. firmus</i> 8	12,0	7,0	1,71



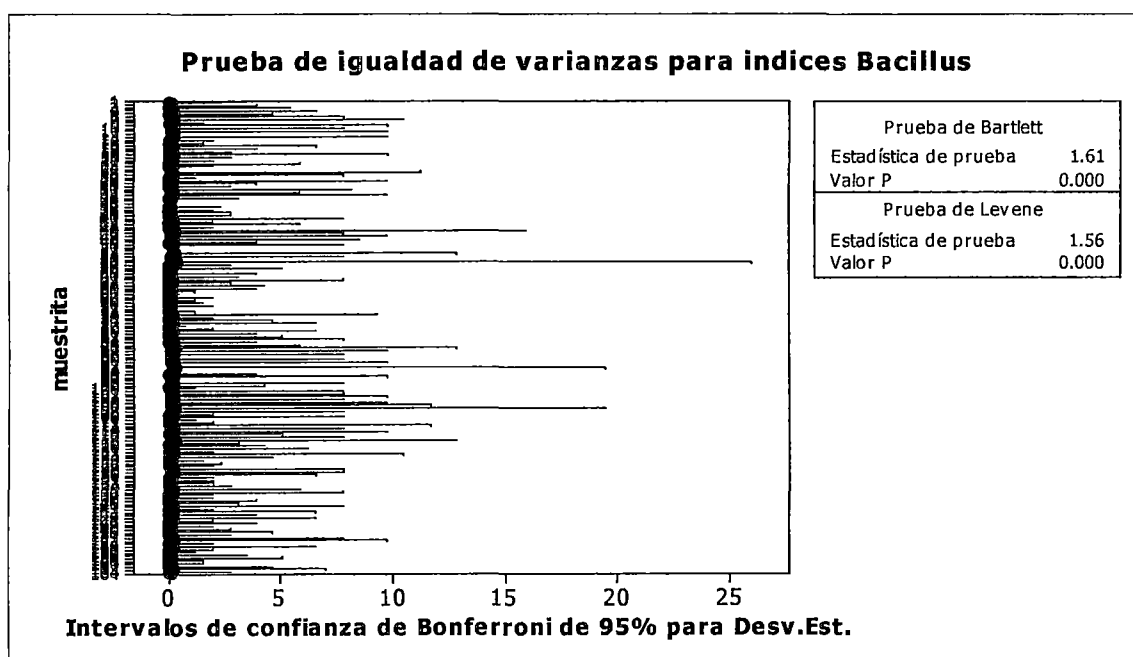
Continuación....

<i>Bacillus</i> spp.	Halo más colonia (mm)	Colonia (mm)	I S	<i>Bacillus</i> spp.	Halo más colonia (mm)	Colonia (mm)	I S
<i>B. licheniformis</i> 22	12,0	7,0	1,71	<i>B. licheniformis</i> 155	7,0	5,0	1,40
<i>B. lentus</i> 85	15,0	9,0	1,67	<i>B. cereus</i> 79	11,0	8,0	1,38
<i>B. circulans</i> 135	10,0	6,0	1,67	<i>B. cereus</i> 62	11,0	8,0	1,38
<i>B. cereus</i> 32	10,0	6,0	1,67	<i>B. cereus</i> 64	11,0	8,0	1,38
<i>B. circulans</i> 43	5,0	3,0	1,67	<i>B. circulans</i> 17	12,0	9,0	1,33
<i>B. firmus</i> 123	5,0	3,0	1,66	<i>B. sphaericus</i> 65	12,0	9,0	1,33
<i>B. firmus</i> 134	13,0	8,0	1,63	<i>B. sphaericus</i> 122	12,0	9,0	1,33
<i>B. circulans</i> 149	16,0	10,0	1,60	<i>B. licheniformis</i> 142	12,0	9,0	1,33
<i>B. lentus</i> 40	8,0	5,0	1,60	<i>B. lentus</i> 68	12,0	9,0	1,33
<i>B. circulans</i> 33	8,0	5,0	1,60	<i>B. subtilis</i> 146	12,0	9,0	1,33
<i>B. cereus</i> 28	8,0	5,0	1,60	<i>B. sphaericus</i> 154	12,0	9,0	1,33
<i>B. circulans</i> 19	8,0	5,0	1,60	<i>B. lentus</i> 133	12,0	9,0	1,33
<i>B. cereus</i> 31	8,0	5,0	1,60	<i>B. brevis</i> 3	8,0	6,0	1,33
<i>B. circulans</i> 1	8,0	5,0	1,60	<i>B. firmus</i> 159	8,0	6,0	1,33
<i>B. lentus</i> 77	8,0	5,0	1,60	<i>B. circulans</i> 72	8,0	6,0	1,33
<i>B. Circulans</i> 48	8,0	5,0	1,60	<i>B. lentus</i> 82	8,0	6,0	1,33
<i>B. Circulans</i> 84	11,0	7,0	1,57	<i>B. circulans</i> 73	8,0	6,0	1,33
<i>B. firmus</i> 147	11,0	7,0	1,57	<i>B. circulans</i> 27	6,0	4,5	1,33
<i>B. firmus</i> 49	7,0	4,5	1,56	<i>B. circulans</i> 69	4,0	3,0	1,33
<i>B. circulans</i> 20	15,0	10,0	1,50	<i>B. circulans</i> 15	13,0	10,0	1,30
<i>B. lentus</i> 18	12,0	8,0	1,50	<i>B. circulans</i> 161	13,0	10,0	1,30
<i>B. circulans</i> 37	9,0	6,0	1,50	<i>B. lentus</i> 10	13,0	10,0	1,30
<i>B. lentus</i> 70	9,0	6,0	1,50	<i>B. firmus</i> 34	9,0	7,0	1,29
<i>B. lentus</i> 25	9,0	6,0	1,50	<i>B. cereus</i> 61	9,0	7,0	1,29
<i>B. lentus</i> 35	9,0	6,0	1,50	<i>B. lentus</i> 75	9,0	7,0	1,29
<i>B. licheniformis</i> 126	9,0	6,0	1,50	<i>B. sphaericus</i> 125	9,0	7,0	1,29
<i>B. lentus</i> 30	9,0	6,0	1,50	<i>B. lentus</i> 160	9,0	7,0	1,29
<i>B. circulans</i> 39	9,0	6,0	1,50	<i>B. circulans</i> 164	15,0	12,0	1,25
<i>B. lentus</i> 7	9,0	6,0	1,50	<i>B. circulans</i> 63	10,0	8,0	1,25
<i>B. circulans</i> 139	9,0	6,0	1,50	<i>B. circulans</i> 158	10,0	8,0	1,25
<i>B. licheniformis</i> 60	9,0	6,0	1,50	<i>B. firmus</i> 157	11,0	9,0	1,22
<i>B. circulans</i> 29	9,0	6,0	1,50	<i>B. circulans</i> 66	11,0	9,0	1,22
<i>B. circulans</i> 2	9,0	6,0	1,50	<i>B. circulans</i> 156	12,0	10,0	1,22
<i>B. lentus</i> 74	9,0	6,0	1,50	<i>B. circulans</i> 138	12,0	10,0	1,20
<i>B. circulans</i> 76	6,0	4,0	1,50	<i>B. lentus</i> 148	12,0	10,0	1,20
<i>B. circulans</i> 162	13,0	9,0	1,44	<i>B. circulans</i> 71	12,0	10,0	1,20
<i>B. circulans</i> 124	10,0	7,0	1,43	<i>B. circulans</i> 132	12,0	10,0	1,20
<i>B. circulans</i> 121	10,0	7,0	1,43	<i>B. sphaericus</i> 163	12,0	10,0	1,20
<i>B. circulans</i> 130	10,0	7,0	1,43	<i>B. firmus</i> 151	13,0	11,0	1,18
<i>B. lentus</i> 80	14,0	10,0	1,40	<i>B. firmus</i> 67	11,0	10,0	1,10
<i>B. circulans</i> 145	7,0	5,0	1,40	<i>B. lentus</i> 78	12,0	11,0	1,09

## ANEXO 9



Prueba de normalidad para el índice de solubilización de fosfato dicálcico y tricálcico por *Bacillus* spp. aisladas de suelo rizosférico de *Zea mays* L. en Reque, 2014



Prueba de homogeneidad de varianza para el índice de solubilización de fosfato dicálcico y tricálcico por *Bacillus* spp. aisladas de suelo rizosférico de *Zea mays* L. en Reque, 2014

## ANEXO 10

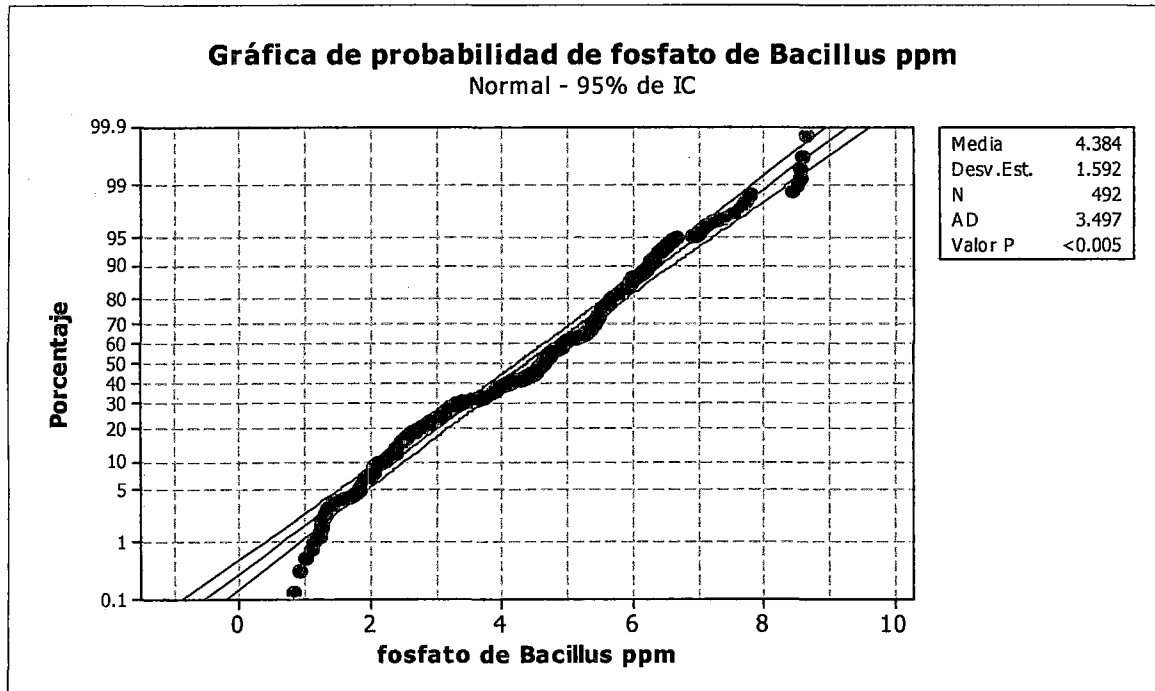
### Fósforo soluble (ppm) por *Bacillus* spp.

<i>Bacillus</i> spp.	P (ppm)	<i>Bacillus</i> spp.	P (ppm)
<i>B.firmus</i> 36	8,60	<i>B.lentus</i> 80	5,51
<i>B.firmus</i> 53	8,50	<i>B.circulans</i> 23	5,44
<i>B.firmus</i> 105	7,69	<i>B.circulans</i> 87	5,43
<i>B.sphaericus</i> 6	7,68	<i>B.firmus</i> 107	5,43
<i>B.subtilis</i> 99	7,41	<i>B.cereus</i> 126	5,43
<i>B.circulans</i> 91	7,10	<i>B.lentus</i> 13	5,41
<i>B.cereus</i> 45	7,01	<i>B.sphaericus</i> 115	5,41
<i>B.firmus</i> 98	7,01	<i>B.cereus</i> 143	5,41
<i>B.firmus</i> 55	6,60	<i>B.cereus</i> 150	5,39
<i>B.circulans</i> 81	6,50	<i>B.firmus</i> 50	5,38
<i>B.subtilis</i> 97	6,49	<i>B.circulans</i> 56	5,38
<i>B. circulans</i> 37	6,40	<i>B.cereus</i> 129	5,36
<i>B.lentus</i> 12	6,34	<i>B.brevis</i> 113	5,35
<i>B.cereus</i> 89	6,30	<i>B.cereus</i> 141	5,28
<i>B.circulans</i> 19	6,28	<i>B.circulans</i> 29	5,26
<i>B.circulans</i> 14	6,27	<i>B.subtilis</i> 88	5,26
<i>B.lentus</i> 35	6,27	<i>B.lentus</i> 10	5,22
<i>B.licheniformes</i> 60	6,24	<i>B.circulans</i> 4	5,21
<i>B.cereus</i> 31	6,21	<i>B.cereus</i> 119	5,15
<i>B.cereus</i> 117	6,11	<i>B.cereus</i> 28	5,13
<i>B.circulans</i> 100	6,06	<i>B.lentus</i> 44	5,09
<i>B.circulans</i> 39	5,99	<i>B.cereus</i> 135	4,97
<i>B.lentus</i> 16	5,97	<i>B.lentus</i> 18	4,96
<i>B.cereus</i> 96	5,96	<i>B.lentus</i> 41	4,94
<i>B.circulans</i> 27	5,93	<i>B.cereus</i> 92	4,93
<i>B.lentus</i> 24	5,90	<i>B.lentus</i> 52	9,20
<i>B.lentus</i> 25	5,89	<i>B.cereus</i> 128	4,91
<i>B.lentus</i> 70	5,89	<i>B.brevis</i> 3	4,87
<i>B.circulans</i> 63	5,82	<i>B.circulans</i> 51	4,87
<i>B.circulans</i> 76	5,71	<i>B.cereus</i> 120	4,79
<i>B.cereus</i> 136	5,70	<i>B.licheniformes</i> 22	4,78
<i>B.cereus</i> 144	5,70	<i>B.circulans</i> 43	4,77
<i>B.circulans</i> 2	5,68	<i>B.cereus</i> 152	4,76
<i>B.licheniformis</i> 114	5,67	<i>B.lentus</i> 7	4,71
<i>B.sphaericus</i> 110	5,66	<i>B.subtilis</i> 94	4,70
<i>B.subtilis</i> 90	5,57	<i>B.sphaericus</i> 57	4,69
<i>B.cereus</i> 5	5,56	<i>B.circulans</i> 73	4,68
<i>B.cereus</i> 103	5,55	<i>B.lentus</i> 11	4,67
<i>B.sphaericus</i> 108	5,55	<i>B.circulans</i> 33	4,67
<i>B.circulans</i> 48	5,53	<i>B.lentus</i> 83	4,65
<i>B.cereus</i> 32	5,52	<i>B.cereus</i> 127	4,64

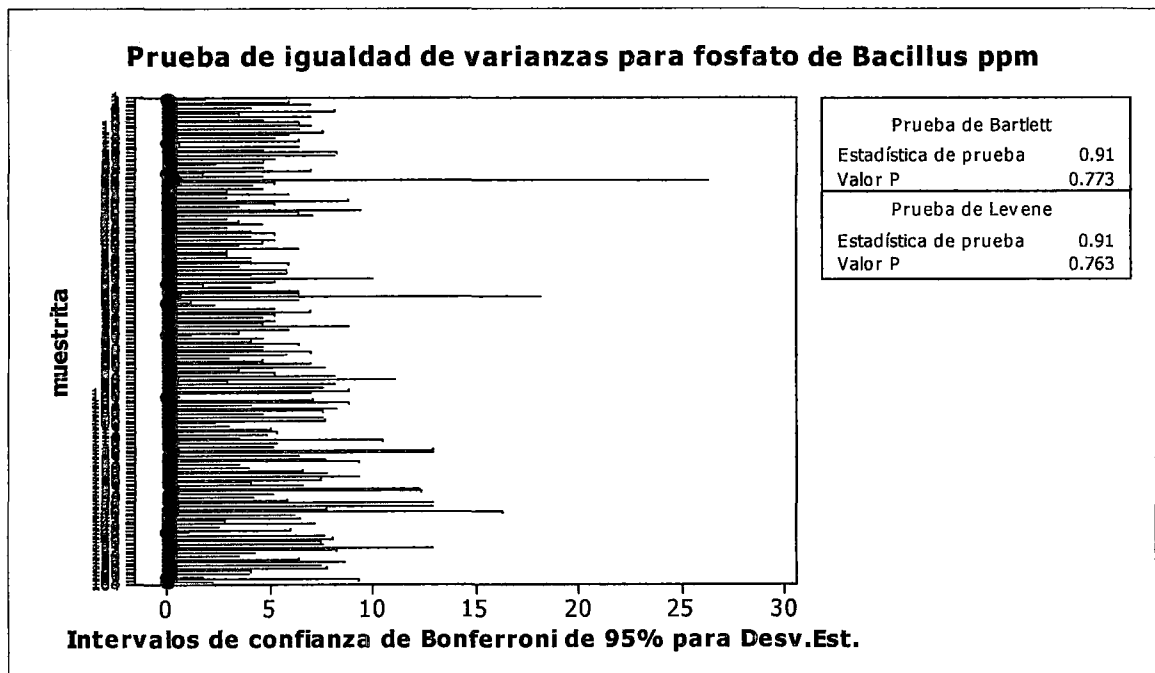
Continuación...

<b>Bacillus spp.</b>	<b>P (ppm)</b>	<b>Bacillus spp.</b>	<b>P (ppm)</b>
<i>B.circulans</i> 15	4,62	<i>B.cereus</i> 147	3,07
<i>B.firmus</i> 8	4,59	<i>B.cereus</i> 112	3,02
<i>B.firmus</i> 9	4,59	<i>B.cereus</i> 123	2,97
<i>B.cereus</i> 122	4,59	<i>B.circulans</i> 161	2,95
<i>B.circulans</i> 21	4,57	<i>B.circulans</i> 164	2,93
<i>B.circulans</i> 20	4,55	<i>B.firmus</i> 104	2,81
<i>B.cereus</i> 118	4,52	<i>B.cereus</i> 138	2,78
<i>B.cereus</i> 131	4,52	<i>B.brevis</i> 102	2,77
<i>B.circulans</i> 69	4,51	<i>B.lentus</i> 75	2,76
<i>B.cereus</i> 62	4,48	<i>B.cereus</i> 132	2,73
<i>B.lentus</i> 85	4,37	<i>B.circulans</i> 17	2,67
<i>B.cereus</i> 26	4,36	<i>B.firmus</i> 67	2,60
<i>B.sphaericus</i> 65	4,36	<i>B.cereus</i> 137	2,55
<i>B.firmus</i> 49	4,29	<i>B.cereus</i> 124	2,52
<i>B.lentus</i> 30	4,12	<i>B.firmus</i> 159	2,52
<i>B.sphaericus</i> 46	4,12	<i>B.cereus</i> 145	2,50
<i>B.cereus</i> 79	4,08	<i>B.lentus</i> 40	2,47
<i>B.cereus</i> 149	4,07	<i>B.lentus</i> 160	2,47
<i>B.cereus</i> 61	4,05	<i>B.circulans</i> 71	2,46
<i>B.cereus</i> 121	3,96	<i>B.cereus</i> 142	2,38
<i>B.circulans</i> 64	3,94	<i>B.sphaericus</i> 163	2,35
<i>B.circulans</i> 162	3,93	<i>B.cereus</i> 148	2,32
<i>B.circulans</i> 54	3,84	<i>B.sphaericus</i> 58	2,31
<i>B.lentus</i> 68	3,84	<i>B.brevis</i> 116	2,30
<i>B.lentus</i> 74	3,84	<i>B.cereus</i> 140	2,23
<i>B.cereus</i> 146	3,84	<i>B.circulans</i> 66	2,10
<i>B.firmus</i> 42	3,79	<i>B.subtilis</i> 101	2,05
<i>B.lentus</i> 59	3,70	<i>B.cereus</i> 111	2,05
<i>B.circulans</i> 95	3,62	<i>B.lentus</i> 38	1,97
<i>B.subtilis</i> 109	3,62	<i>B.lentus</i> 78	1,96
<i>B.circulans</i> 1	3,51	<i>B.circulans</i> 158	1,95
<i>B.lentus</i> 77	3,48	<i>B.cereus</i> 130	1,89
<i>B.circulans</i> 156	3,31	<i>B.cereus</i> 93	1,84
<i>B.cereus</i> 153	3,30	<i>B.licheniformes</i> 155	1,78
<i>B.firmus</i> 34	3,28	<i>B.circulans</i> 72	1,77
<i>B.circulans</i> 47	3,21	<i>B.subtilis</i> 86	1,35
<i>B.cereus</i> 134	3,19	<i>B.brevis</i> 106	1,32
<i>B.firmus</i> 157	3,17	<i>B.cereus</i> 125	1,26
<i>B.lentus</i> 82	3,14	<i>B.cereus</i> 133	1,24
<i>B.circulans</i> 84	3,14	<i>B.cereus</i> 139	1,23
<i>B.sphaericus</i> 154	3,11	<i>B.cereus</i> 151	0,92

## ANEXO 11



Prueba de normalidad de fósforo soluble en medio líquido cultivado con *Bacillus* spp. aisladas de suelo rizosférico de *Zea mays* L. en Reque, 2014



Prueba de homogeneidad de varianza de fósforo soluble en medio líquido cultivado con *Bacillus* spp. aisladas de suelo rizosférico de *Zea mays* L. en Reque, 2014